Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

El incremento de la ingesta materna de grasas saturadas programa alteraciones hepáticas en la descendencia de rata: rol de la desregulación en el accionar de leptina

Mazzucco, María Belén

2016-12-15

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Mazzucco, María Belén. (2016-12-15). El incremento de la ingesta materna de grasas saturadas programa alteraciones hepáticas en la descendencia de rata: rol de la desregulación en el accionar de leptina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Mazzucco, María Belén. "El incremento de la ingesta materna de grasas saturadas programa alteraciones hepáticas en la descendencia de rata: rol de la desregulación en el accionar de leptina". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-12-15.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

El incremento de la ingesta materna de grasas saturadas programa alteraciones hepáticas en la descendencia de rata: rol de la desregulación en el accionar de leptina

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Licenciada María Belén Mazzucco

Director de tesis: Dra. Verónica White

Consejero de estudios: Dra. Paula Vissio

Laboratorio de Reproducción y Metabolismo, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET-UBA)

Fecha de defensa: 15 de Diciembre de 2016

El incremento de la ingesta materna de grasas saturadas programa alteraciones hepáticas en la descendencia de rata: rol de la desregulación en el accionar de leptina

Resumen: Se estableció un modelo de sobrepeso mediante la alimentación de ratas Wistar con una dieta con exceso de grasas saturadas previamente y durante la gestación y la lactancia (grupo DGS). El grupo DGS presentó un aumento de los niveles plasmáticos de triglicéridos, insulina y leptina en madres y fetos, y un incremento en el peso placentario y fetal, respecto del grupo control.

Se estudió el hígado de fetos y crías de 21 y 140 días de edad. En los hígados de fetos y crías provenientes del grupo DGS se observó un aumento de parámetros indicadores de ambiente pro-oxidante. Además, el grupo DGS presentó una disminución de los niveles de ARN mensajero de genes asociados a la detoxificación hepática y un aumento en la actividad de enzimas hepáticas en circulación. Los hígados del grupo DGS presentaron sobreacumulación de triglicéridos, una disminución de los niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el catabolismo de lípidos y una alterada expresión del receptor de leptina.

La administración de leptina a fetos control a término moduló los niveles placentarios de ARN mensajero del receptor de leptina y de la lipoproteína lipasa (LPL), clave en la transferencia de lípidos placentarios. Asimismo, la leptina administrada moduló los niveles de ARN mensajero del receptor de leptina y de LPL en el hígado fetal. Sin embargo, los hígados de fetos del grupo DGS no mostraron alteraciones en los niveles de ARN mensajero del receptor de leptina y de LPL a pesar de estar expuestos a hiperleptinemia fetal. Más aún, los resultados del cultivo de hígados fetales con leptina evidenciaron una falta de respuesta a las acciones lipolíticas de la leptina en el grupo DGS.

Estos resultados sugieren que las alteraciones en el metabolismo lipídico hepático fetal observadas en el grupo DGS estarían asociadas a una desregulación del accionar de leptina. La persistencia de alteraciones hepáticas en las crías sugiere una programación de anomalías de manera intrauterina, desafiando la salud metabólica de la descendencia.

Palabras clave: dieta grasa, gestación, feto, descendencia, placenta, hígado, lípidos, leptina, estrés oxidativo.

An overload of saturated fat in maternal diet programs liver disorders in the offspring of rats: role of the deregulation of leptin actions

Summary: An overweight model was established by feeding Wistar rats with an overload of saturated fat previously and during pregnancy and lactation (DGS group). The DGS group showed increased maternal and fetal triglyceridemia, insulinemia and leptinemia, and increased placental and fetal weight when compared to the control group.

The liver from fetuses and offspring of 21 and 140 days old was studied. The liver from fetuses and offspring from the DGS group showed an increase in the indicators of a pro-oxidant environment and a decrease in the levels of mRNA of genes associated with detoxifying functions. In addition, the DGS group showed an increase in the activity of hepatic enzymes in plasma. Besides, the livers from the DGS group showed triglyceride overaccumulation, decreased levels of mRNA of genes involved in lipid catabolism and altered expression of leptin receptor.

The administration of leptin to control fetuses modulated placental mRNA levels of leptin receptor and of a key gene in placental lipid transfer, the lipoprotein lipase (LPL). Also, we found that the administration of leptin modulated the mRNA levels of LPL and leptin receptor in the fetal liver. Despite the fetuses from the DGS group are inmerse in a hyperleptinemic environment, the levels of the mRNA of LPL and leptin receptor in fetal liver showed no changes when compared to control. In addition, the culture of fetal livers with leptin showed no response to the lipolytic actions of leptin in the DGS group.

These results suggest that the alterations in the lipid metabolism of fetal liver observed in the DGS group could be associated with the dysregulation of leptin action. The persistence of hepatic alterations in the offspring suggests that these anomalies are programmed during the intrauterine life, challenging the metabolic health of the offspring.

Keywords: fat diet, pregnancy, fetus, offspring, placenta, liver, lipids, leptin, oxidative stress.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a quienes me acompañaron y colaboraron en la realización de esta tesis:

A la Dra Verónica White por su compromiso y dedicación en la dirección de esta tesis y por la paciente enseñanza, tan valiosa en mi formación científica.

A la Dra Alicia Jawerbaum por la invaluable enseñanza y ayuda brindada a lo largo de este camino.

Al CONICET y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por su aporte económico y académico.

Al Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos por brindarme un lugar para formarme en mi carrera científica y a todos los integrantes de esta institución que colaboraron en el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeras de laboratorio y amigas Day, Eva, Romi, Sabri, Ivi, Nora y Meli, con quienes tuve la suerte de compartir esta experiencia y quienes me brindaron una hermosa compañía, apoyo y ayuda incondicional.

A mis amigos del piso 16 y 17 por los lindos momentos compartidos.

A mamá y papá, por su confianza, amor y apoyo, tanto en este proyecto como en el resto de los momentos de mi vida.

A mis hermanas, amigas incondicionales, con quienes tengo la inmensa fortuna de transitar la vida.

A Leo, quien con su amor, compañía y apoyo me hace feliz en el día a día, y a Augusto, quien me tiene locamente enamorada.

El contenido de esta tesis ha sido parcialmente publicado en:

Maternal saturated fat-rich diet promotes leptin resistance in fetal liver lipid catabolism and programs lipid homeostasis impairments in the liver of rat offspring. María Belén Mazzucco, Romina Higa, Daiana Fornes, Evangelina Capobianco, Alicia Jawerbaum, Veronica White. *J Nutr Biochem* 27:61-9 (2016).

Saturated-fat-rich diet increases fetal lipids and modulates LPL and receptor expression in rat placentas. Mazzucco M.B., Higa R., Capobianco E., Kurtz M., Jawerbaum A., White V. *J Endocrinol* 217(3):303-15 (2013).

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 1

1. PROGRAMACIÓN METABÓLICA 2

2. LA PLACENTA 3
   2.1. La placenta de rata 3
   2.2. Homología entre la placenta de rata y la placenta humana 6
   2.3. Transporte de nutrientes placentario 7

3. LOS LÍPIDOS 10
   3.1. Estructura, función y metabolismo 10
   3.2. Metabolismo lipídico en la gestación 14

4. LA INSULINA 17
   4.1. Síntesis y regulación 17
   4.2. Funciones 17
   4.3. Receptor y señalización 18

5. El HÍGADO 21
   5.1. Características 21
   5.2. Metabolismo de hidratos de carbono 22
   5.3. Metabolismo de los lípidos 23
   5.4. Función de detoxificación 28

6. LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y DEL NITRÓGENO 32

7. LA LEPTINA 36
   7.1. Características 36
   7.2. Receptores y señalización 38
   7.3. Funciones 41
   7.4. Regulación de la leptina 44
   7.5. Leptina y gestación 45

8. EL SOBREPESO Y LA OBESIDAD 47
   8.1. Epidemiología 47
   8.2. Características 48
   8.3. La obesidad y el hígado 49
   8.4. Resistencia a leptina 50
   8.5. Gestación y obesidad 51

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 52

MATERIALES Y MÉTODOS 56

1. MATERIALES 57
1.1. Sales y solventes 57
1.2. Drogas y reactivos 58
1.3. Anticuerpos 58
1.4. Equipos comerciales de determinación colorimétrica 59
1.5. Equipos comerciales de revelado 59
1.6. Programas de análisis de imagen 59
1.7. Programa de análisis estadístico 59
1.8. Otros 59

2. MÉTODOS 60
2.A. Animales 60
2.A.1. Tratamientos dietarios: modelo materno de sobrepeso 60
2.A.2. Obtención de plasma materno y fetal, placentas y órganos fetales 61
2.A.3. Cultivo de explantos fetales con leptina 62
2.A.4. Administración intra-fetal de leptina en ratas control 63
2.A.5. Estudios en la descendencia de rata 64
2.B. Determinaciones 65
2.B.1. Determinación de proteínas 65
2.B.2. Determinación de la producción de óxido nítrico (ON) 66
2.B.3. Determinación de los niveles de lipoperóxidos 66
2.B.4. Determinación de los niveles de lípidos 66
2.B.5. Determinación de niveles de ObR, RI y PPARα mediante Western blot 67
2.B.6. Inmunolocalización de ObR y residuos de nitrotirosina 68
2.B.7. Análisis semicuantitativo del ARN mensajero de leptina, ObR, RI, PPARα, LPL, LE, ACO, CPT-1, MRP 2, 3 y 4, Nrf2, vWF y CTK 70
2.B.8. Análisis en tiempo real del ARN mensajero de ObRb 72
2.B.9. Ensayos metabólicos 73
2.B.10. Análisis estadístico 74

RESULTADOS 75

Capítulo 1: Efectos del exceso moderado de grasas saturadas en la dieta materna: caracterización del modelo dietario. 76
1.1. Composición nutricional de los tratamientos dietarios. 76
1.2. Consumo dietario previo y durante la gestación. 77
1.3. Efecto del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre el peso materno, fetal, placentario, de órganos fetales y sobre el número de fetos por camada. 80
1.4. Efecto del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la glucemia, trigliceridemia y colesterolemia materna y fetal. 83
1.5. Efecto del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la insulinemia y leptinemia materna y fetal. 85

1.6. Efecto del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa. 86
Resumen del Capítulo 1 88

Capítulo 2: Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna y de inyecciones intra-fetales de leptina sobre la placenta 89
Parte A: Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la placenta. 89
2.A.1. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la producción de óxido nítrico y niveles de peroxidación lipídica placentaria. 90
2.A.2. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de lípidos placentarios. 90
2.A.3. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de ARN mensajero de lipasas placentarias. 92
2.A.4. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de ARN mensajero de leptina y receptores de leptina placentarios. 93
2.A.5. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de ARN mensajero del receptor de insulina placentario. 97
2.A.6. Efecto de leptina fetal sobre la formación de tubos en células endoteliales humanas. 99
2.A.7. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de ARN mensajero de vWF y CTK7. 101
Parte B: Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre la placenta. 103
2.B.1. Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre los niveles de ARN mensajero del receptor de insulina placentario. 104
2.B.2. Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre los niveles de ARN mensajero del receptor de leptina placentario. 106
2.B.3. Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre los niveles de ARN mensajero de lipasas placentarias. 107
2.B.4. Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre los niveles de ARN mensajero de vWF y CTK7. 107
Resumen del Capítulo 2 109

Capítulo 3: Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna y de inyecciones intra-fetales de leptina sobre el hígado fetal 110
Parte A: Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre el hígado fetal. 110
3.A.1. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de lípidos en el hígado fetal. 111
3.A.2. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la expresión del receptor de insulina en el hígado fetal. 112
3.A.3. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la expresión de leptina y los receptores de leptina en el hígado fetal. 114
3.A.4. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de ARN mensajero de PPARα, ACO, CPT1 y LPL, genes involucrados en el catabolismo de lípidos en el hígado fetal. 119

3.A.5. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre parámetros de estrés oxidativo y de detoxificación hepática en el hígado fetal. 121
Parte B: Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre el hígado fetal. 126
3.B.1. Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre los niveles de ARN mensajero del receptor de insulina en el hígado fetal. 126
3.B.2. Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre el receptor de leptina en el hígado fetal. 127
3.B.3. Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre los niveles de ARN mensajero de ACO, CPT1, LPL y PPARα, genes involucrados en el catabolismo de lípidos. 128
Resumen del Capítulo 3 130

Capítulo 4: Efecto de leptina sobre el catabolismo de lípidos en el hígado de fetos provenientes de ratas control y de ratas alimentadas con exceso de grasas saturadas 131
4.1. Efectos de leptina sobre la expresión de LPL y del receptor de insulina en cultivo de explantos de hígados fetales. 132
4.2. Efectos de leptina sobre la expresión del receptor de leptina en cultivo de explantos de hígados fetales 134
4.3. Efecto de leptina sobre los niveles de lípidos de explantos de hígados fetales. 137
4.4. Efectos de leptina sobre los niveles de ARN mensajero de PPARα, ACO, CPT1 y LPL en cultivo de explantos de hígados fetales. 139
Resumen del Capítulo 4 143

Capítulo 5: Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre el metabolismo lipídico hepático de crías de 21 y 140 días de edad 144
Parte A: Crías de 21 días de edad 145
5.A.1. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre el peso, glucemia, trigliceridemia y colesterolemia en crías de 21 días de edad. 145
5.A.2. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de lípidos hepáticos en crías de 21 días de edad. 146
5.A.3. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de ARN mensajero del receptor de leptina en crías de 21 días de edad. 147
5.A.4. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de ARN mensajero de ACO, CPT1, LPL y PPARα, genes involucrados en el catabolismo de lípidos en el hígado de crías de 21 días de edad. 150
5.A.5. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre indicadores de daño por estrés oxidativo y nitrativo y parámetros de detoxificación hepática en crías de 21 días de edad. 151
Parte B: Crías de 140 días de edad. 155
5.B.1. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre el peso, glucemia, trigliceridemia y colesterolemia en crías de 140 días de edad. 155
5.B.2. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la insulinemia y la resistencia a la insulina en crías de 140 días de edad. 156
5.B.3. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de lípidos hepáticos en crías de 140 días de edad. 157

5.B.4. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la expresión del receptor de leptina en crías de 140 días de edad. 159
5.B.5. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de ARN mensajero de ACO, CPT1, LPL y PPARα, genes involucrados en el catabolismo de lípidos, en crías de 140 días de edad. 162
5.B.6. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre indicadores de daño por estrés oxidativo y nitrativo y parámetros de detoxificación hepática en crías de 140 días de edad. 163
Resumen del Capítulo 5 167

DISCUSIÓN 169

CONCLUSIÓN 185

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 189

ABREVIATURAS

ACC: acetil-CoA carboxilasa

ACO: acil-CoA oxidasa

AGL: ácidos grasos libres

AMPK: kinasa activada por AMP cíclico

ChREBP: elemento de respuesta a carbohidratos

CPT1: carnitina palminoil transferasa 1

FABP: proteínas de unión a ácidos grasos

FAT: proteínas translocasas de ácidos grasos

FATP: proteínas transportados de ácidos grasos

FAS: sintasa de ácidos grasos

HDL: lipoproteínas de alta densidad

IDL: lipoproteína de densidad intermedia

IGF: factor de crecimiento similar a la insulina

IMC: índice de masa corporal

IRA: isoforma corta del receptor de insulina

IRB: isoforma larga del receptor de insulina

IRS: sustratos del receptor de insulina

MRP: proteína asociada a resistencia a multidrogas

mTOR: blanco de rapamicina en células de mamífero

Nrf2: factor nuclear (derivado de eritroide 2)

LE: lipasa endotelial

LDL: lipoproteínas de baja densidad

LPL: lipoproteína lipasa

ObRa: isoforma corta del receptor de leptina

ObRb: isoforma larga del receptor de leptina

ObRe: isoforma soluble del receptor de leptina

ON: óxido nítrico

PPARα: receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales alfa

PPARγ: receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales gama

PTP1B: proteína fosfatasa de tirosina 1B

Q: quilomicrones

RI: receptor de insulina

ROS: especies reactivas del oxígeno

SOCS3: supresor de la señalización de citoquinas 3

SREBP1: Proteína de Unión al Elemento de Respuesta a los Esteroles

Tg: triglicéridos

TLR: toll-like receptor

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

Demás abreviaturas son indicadas en el texto

INTRODUCCIÓN

1. PROGRAMACIÓN METABÓLICA

En la mayoría de los mamíferos, incluyendo el ser humano, los órganos y los sistemas homeostáticos se desarrollan durante la vida prenatal. Esta es una etapa de gran plasticidad, y en consecuencia de alta susceptibilidad a los cambios ambientales. Es por ello que el entorno metabólico *in útero* establece patrones fisiológicos que programan el funcionamiento de órganos y sistemas del individuo. El concepto de "programación fetal" data de varios años atrás, cuando Barker y colaboradores describieron, en 16.000 sujetos en Inglaterra, que las tasas de muerte por enfermedad cardiovascular disminuían a la mitad en aquéllos que habían nacido con un peso normal en comparación con aquéllos que habían nacido pequeños para la edad gestacional *(Barker y Osmond 1986)*. Otros indicadores antropométricos de un alterado crecimiento fetal, por ejemplo, peso, talla, baja circunferencia abdominal y una elevada relación entre el peso del feto y el peso de la placenta fueron asociados con el desarrollo de enfermedades crónica en la vida adulta *(Barker y col. 1989, Barker y col. 1993, Barker 2007)*. La hipótesis de Barker estimuló el interés por conocer la influencia de la salud fetal sobre los trastornos en el adulto, interés que impulsó la formación de la Sociedad Internacional Orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (DoHad: Developmental origins of health and disease). La teoría de la DoHad postula que durante la vida temprana (concepción, embarazo, lactancia e infancia) la interacción del individuo con factores maternos y/o ambientales condiciona su crecimiento y desarrollo influyendo sobre la salud a largo plazo.

En la actualidad se conoce que eventos adversos como la desnutrición, obesidad, patologías cardiovasculares, síndrome metabólico, diabetes y otras patologías durante el embarazo pueden modificar el ambiente intrauterino, conduciendo a cambios en los perfiles metabólicos y hormonales de la madre y el feto y a alteraciones epigenéticas que pueden traducirse en la aparición de desórdenes endocrino-metabólicos en la vida posnatal *(Diaz y col. 2014, Dimasuay y col. 2016, Sferruzzi-Perri y Camm 2016)*.

En el proceso de programación fetal la función de la placenta es fundamental, ya que ésta es el órgano de intercambio materno-fetal, encargada de eliminar los desechos fetales y transportar gases y nutrientes, procesos que regulan el crecimiento y la composición corporal del feto y por lo tanto su salud metabólica.

2. LA PLACENTA

En los embriones de los mamíferos euterios, las funciones nutricionales son asumidas por un órgano altamente especializado, que sostiene el normal crecimiento y desarrollo del feto: la placenta. La placenta sensa y responde frente a cambios en el entorno intrauterino modificando su estructura y función, regulando el flujo sanguíneo, el suministro de nutrientes y la secreción de hormonas y moléculas de señalización. El transporte de nutrientes a través de la placenta determina la disponibilidad de nutrientes por parte del feto, sustentando su crecimiento y desarrollo. Entonces, el crecimiento fetal se encuentra profundamente influenciado por la nutrición materna, que puede inducir cambios en el metabolismo y niveles hormonales maternos modulando así algunas funciones placentarias *(Dimasuay y col. 2016)*. Por su parte, el feto utiliza los nutrientes transferidos desde la madre, produciendo metabolitos y hormonas que impactan a su vez en la placenta y modulan su función. Se establece así un diálogo materno-fetal en el que la placenta es interlocutora necesaria. Estos conceptos dieron pie a un nuevo paradigma que sugiere que el feto es capaz de modular la transferencia de nutrientes placentaria en función de sus necesidades *(Jansson y Powell 2006, Forhead y Fowden 2009, Diaz y col. 2014)*.

2.1. LA PLACENTA DE RATA

A partir del evento implantatorio el trofoblasto invade el endometrio materno, que se decidualiza *(Abrahamsohn y Zorn 1993)*. Este proceso da lugar a la formación del laberinto placentario, región de la placenta formada por cordones de trofoblastos sin final ciego que penetran la pared uterina y se ramifican en forma similar a un laberinto *(Adamson y col. 2002)*. Agunos trofoblastos se separan e invaden la pared uterina de manera instersticial, abriendo espacios donde los sinusoides arteriales maternos vuelcan su contenido una vez iniciada la función placentaria. En la rata, la placenta comienza a ser funcional a partir del día 12-13 de preñez, y la nutrición, hasta ese momento histotrófica, pasa a ser hemotrófica *(Adamson y col. 2002)*. En el día 12 de preñez tres zonas fisiológica y anatómicamente diferentes pueden ser visualizadas en la placenta de rata: la zona del laberinto, la zona de unión, limitada por una capa discontinua de células gigantes del trofoblasto, y la última zona llamada decidua materna *(Soares y col. 2012)* (**Esquema 1**).

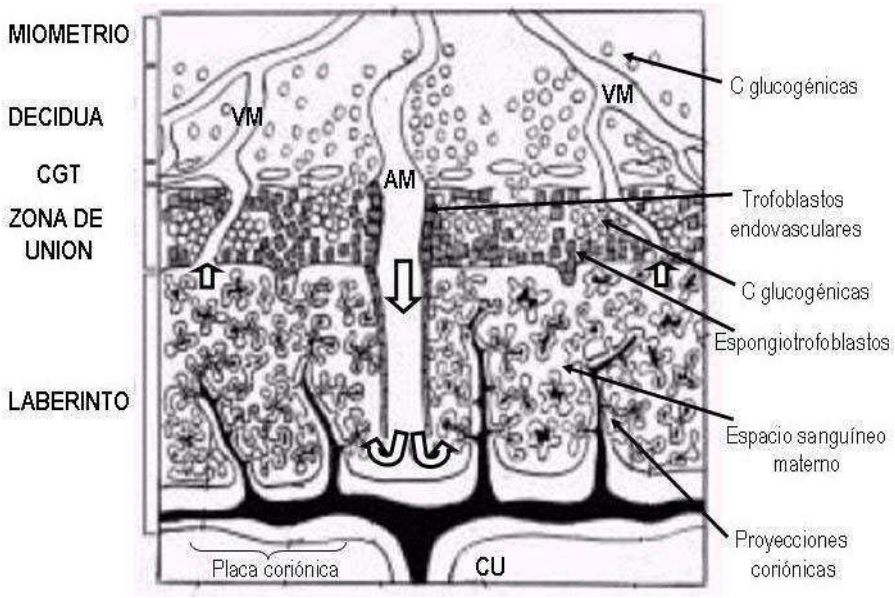
La zona del *laberinto* está compuesta por cordones de células del trofoblasto embrionario bañados por sangre materna. Limita hacia el lado fetal con la placa coriónica, en la cual se inserta el cordón umbilical que contiene a las arterias y venas fetales se ramifican prolongándose por dentro

de los cordones de trofoblastos. Los capilares arteriales y venosos fetales se rodean de tres capas de trofoblastos (placenta hemotricorial): en contacto con el endotelio fetal se encuentra una capa de trofoblastos unicelulares (citotrofoblastos) seguida por dos capas de trofoblastos multinucleados (sinciciotrofoblastos) en contacto con la sangre materna. Estas tres capas, sin embargo, funcionan como una sola, dado que la primera capa de citotrofoblastos es discontinua y la segunda capa se une a la tercera por medio de uniones estrechas *(Georgiades y col. 2002)*. El intercambio de nutrientes, gases y sustancias entre la madre y el feto se lleva a cabo en las ramificaciones más delgadas, donde el endotelio fetal es más permeable debido a la delgadez de la pared endotelial y la presencia de poros.

La *zona de unión* es la región subsiguiente al laberinto, está constituida por trofoblastos pero no posee circulación fetal. Los trofoblastos de esta región tienen alta capacidad invasiva y son productores de hormonas. Además, tienen acceso directo a la sangre materna, por lo que las hormonas producidas en esta región como la lactógeno placentaria I y II y otras, son liberadas de manera directa a la circulación materna redireccionando el sistema endócrino materno y modulando cambios necesarios para el desarrollo de la preñez *(Cross y col. 1994)*. Cuatro linajes de células del trofoblasto se diferencian a partir de células progenitoras de trofoblastos y contituyen esta zona: i) células gigantes del trofoblasto, ii) espongiotrofoblastos, iii) células de glucógeno y iv) células trofoblásticas invasoras *(Soares y col. 2012)*. Las células gigantes del trofoblasto se encuentran bordeando la zona de unión de la placenta formando una capa discontinua. Son las principales células endocrinas de la placenta y poseen capacidad invasiva. Además, existen subpoblaciones de este tipo celular en otros lugares específicos dentro de la placenta *(Georgiades y col. 2002)*. Los espongiotrofoblastos son los principales constituyentes de la zona de unión y también contribuyen a la función endocrina de la placenta. Las células de glucógeno aparecen alrededor del día 13 de preñez. Poseen la capacidad de almacenar glucógeno y de invadir la arteria uterina materna produciendo modificaciones en los componentes de la pared vascular y aumentando el flujo sanguíneo *(Georgiades y col. 2002)*. En la placenta madura se las encuentra formando grupos delimitados por espongiotrofoblastos *(Kaufmann y col. 2003)*. Las células trofoblásticas invasoras migran desde la zona de unión y entran en el compartimento de la zona mesometrial del útero, donde penetran y rodean las arterias espiraladas uterinas, jugando un papel clave en su remodelación. Las células invasoras endovasculares reemplazan el endotelio, mientras que las células trofoblásticas intersticiales permanecen situadas entre la vasculatura *(Malassine y col. 2003)*.

Por último, se encuentra la zona de tejido uterino modificado que constituye la cara materna de la placenta. Este tejido uterino se denomina “decidua” y se encuentra limitado por las células

trofoblásticas y el miometrio. Esta región es progresivamente invadida por los trofoblastos gigantes y las células de glucógeno *(Cross 1998)*.



Esquema 1: Placenta madura de rata con las tres zonas que la constituyen: laberinto, zona de unión y decidua. VM: vena materna, AM arteria materna, CGT: células gigantes del trofoblasto, CU: cordón umbilical. Las flechas indican el sentido de la circulación placentaria. Adaptado de Georgiades y col., 2002.

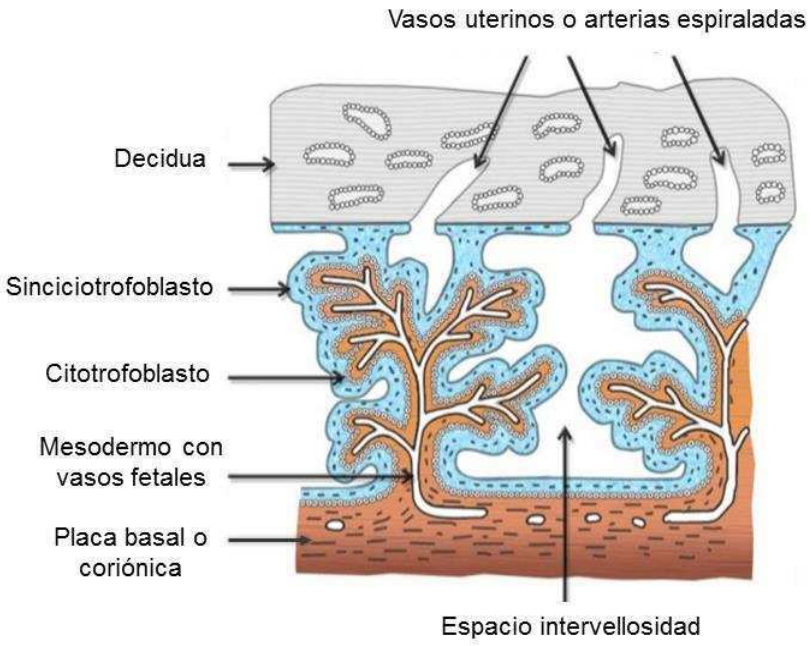
Si bien en la preñez murina la principal síntesis de estrógenos y progesterona la realiza el cuerpo lúteo *(Malassine y col. 2003)*, hasta mediados de la gestación es la hipófisis la encargada de secretar prolactina para sostener la función endócrina del cuerpo lúteo y así mantener la función ovárica. Luego es la placenta la que sintetiza y secreta hormonas tipo prolactina para estimular dicha función. Durante la gestación murina se sintetizan las hormonas lactógeno placentaria I y II, que a través de la unión a los receptores de prolactina mantienen la función esteroidogénica del cuerpo lúteo *(Galosy y Talamantes 1995)*.

2.2. HOMOLOGÍA ENTRE LA PLACENTA DE RATA Y LA PLACENTA HUMANA

A diferencia de lo que ocurre en la rata, en el humano, durante las primeras ocho semanas de gestación, previo al establecimiento de la placenta, la función endócrina del cuerpo lúteo es mantenida por la hormona gonadotrofina coriónica (hCG) producida por el embrión *(Jameson y Hollenberg 1993)*. A partir de la semana ocho de gestación, la función endócrina es llevada a cabo por la placenta *(Albrecht y Pepe 1990)*.

La placenta humana (**Esquema 2**) consta de una placa basal o coriónica similar a la de la placenta de rata, en la que arterias y venas radiales fetales se congregan en el cordón umbilical y emiten sus proyecciones por dentro de las vellosidades. Seguidamente se halla la placenta fetal, análoga al laberinto murino, formada por vellosidades troncales que se ramifican limitadamente formando las vellosidades terminales, dando el aspecto de árbol velloso. De manera diferente a lo que se observa en la placenta de rata, las vellosidades de la placenta humana poseen una sola capa sincicial en lugar de tres, estableciendo así la placenta hemomonocorial: vellosidades formadas por la vasculatura fetal rodeada por una sola capa de sinciciotrofoblasto que se encuentra en contacto con la sangre materna y que presenta microvellosidades en la membrana plasmática que aumentan su superficie de intercambio *(Gude y col. 2004)*. La invasión de la pared uterina es llevada a cabo por dos tipos de trofoblastos: los trofoblastos de la vellosidad y los trofoblastos extra-vellosidad. Los primeros permanecen rodeando la vellosidad y posteriormente se fusionan formando una monocapa sincicial (sinciciotrofoblasto). Los trofoblastos extra-vellosidad se separan de las vellosidades, invaden la decidua materna y se diferencian en trofoblastos gigantes multinucleados *(Lyall 2002)*. De manera similar a lo que ocurre en la placenta de rata, las vías de invasión de trofoblastos humanos son: la vía intersticial, mediante la cual los trofoblastos invaden el estroma uterino, y la vía endotelial, mediante la cual los trofoblastos invaden las arterias espiraladas reemplazando a células endoteliales y musculares *(Kaufmann y col. 2003)*.

Las mencionadas homologías permiten la utilización de la placenta de rata como modelo animal para el abordaje del estudio de la placenta humana *(Soares y col. 2012)*.



Esquema 2: Vellosidad de placenta humana. Adaptado de Henry Gray, Anatomy of the Human Body: Development of the Fetal Membranes and Placenta, 1918 (Gray y Lewis 2000).

2.3. TRANSPORTE DE NUTRIENTES PLACENTARIO

El tejido placentario está especializado para proveer al feto de los nutrientes y el oxígeno necesarios para su crecimiento y desarrollo. La glucosa, los aminoácidos, los ácidos grasos y el colesterol son macronutrientes esenciales para un crecimiento fetal adecuado *(Duttaroy 2009, Brett y col. 2014)*.

La *glucosa* es la principal fuente de energía de los tejidos feto-placentarios. El feto utiliza la glucosa como principal sustrato energético, es por ello que la glucemia fetal es menor a la materna, generando un gradiente positivo de glucosa materno-fetal y facilitando su transporte *(Baumann y col. 2002, Brett y col. 2014)*. La gluconeogénesis fetal es mínima y los requerimientos de glucosa por parte del feto son altos, por lo que el feto depende de la glucosa proveniente de la circulación materna para su normal desarrollo *(Kalhan y Parimi 2000)*. La glucosa es captada por el trofoblasto no sólo mediante difusión facilitada de acuerdo a su gradiente de concentración, sino también a través de transportadores (principalmente GLUT1) que aumentan su velocidad de entrada. Estos transportadores son regulados por la concentración de glucosa, siendo estimulados en condiciones de bajos niveles de glucosa, y también son regulados positivamente por el factor de crecimiento IGF1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1) y la hipoxia *(Baumann y col. 2002)*.

Los *aminoácidos* son captados por la placenta a través de transporte activo. Existen numerosos transportadores como el sistema transportador de aminoácidos A y el L, involucrados en el transporte de aminoácidos esenciales y no esenciales en contra del gradiente de concentración *(Jansson 2001, Gaccioli y col. 2015)*. Se ha visto que los transportadores de aminoácidos se encuentran regulados por la nutrición materna, encontrándose aumentados en gestantes obesas *(Rosario y col. 2016)* y disminuidos en gestantes con desnutrición *(Gaccioli y col. 2013)*. La insulina y el factor de crecimiento IGF1 regulan positivamente a mTOR (blanco de rapamicina en células de mamífero), proteína que controla el crecimiento celular y el metabolismo en respuesta a nutrientes, a factores de crecimiento y al estado energético celular *(Guo 2014)*. A través de esta regulación se estimula la síntesis de proteínas en momentos en los que el organismo posee elevadas concentraciones de nutrientes *(Jansson y col. 2006, Sferruzzi-Perri y col. 2007, Rosario y col. 2016)*.

Los *ácidos grasos* son una fuente importante de energía para el feto. Éstos se encuentran en la circulación materna en su forma libre, unidos a la albúmina o formando parte de lípidos más complejos como triglicéridos y contenidos dentro de lipoproteínas *(Abumrad y col. 1999, Brett y col. 2014)*. Los ácidos grasos libres son incorporados a la placenta por difusión o a través del transporte mediado por proteínas transportadoras de ácidos grasos libres, mientras que aquéllos contenidos en lipoproteínas son previamente hidrolizados por lipasas presentes en la membrana del trofoblasto como la lipoproteína lipasa (LPL) y la lipasa endotelial (LE), que se encuentran asociadas a receptores de lipoproteínas *(Lindegaard y col. 2005, Brett y col. 2014, Rodriguez-Cruz y col. 2016)*. La expresión y la actividad de las proteínas implicadas en el transporte de ácidos grasos se encuentran reguladas por la insulina, el IGF-1 y la leptina *(Magnusson-Olsson y col. 2006, Mousiolis y col. 2012)*.

El *colesterol* tiene un papel importante en el desarrollo fetal, ya que es un componente esencial de las membranas y un precursor de las hormonas esteroides. El feto sintetiza colesterol de forma endógena *(Herrera 2002)*, sin embargo, un porcentaje de la demanda fetal de colesterol se incorpora desde la circulación materna, donde esta molécula se encuentra formando parte de lipoproteínas *(Wadsack y col. 2003, Woollett 2011)*. El colesterol se transporta a través de la placenta hacia el feto mediante los transportadores de colesterol de la familia ABC (ATP-Binding Cassette) A1 y G1 principalmente, transportadores situados en el endotelio fetal y en el trofoblasto *(Christiansen-Weber y col. 2000, Stefulj y col. 2009)*.

El crecimiento fetal se relaciona con la disponibilidad de nutrientes maternos y con la capacidad de la placenta de transportar los nutrientes hacia el feto. A su vez, la capacidad de transferencia de nutrientes de la placenta depende de la expansión y características del área de

intercambio y de la cantidad de transportadores funcionales, parámetros que se encuentran influenciados y regulados por el metabolismo materno y fetal *(Jansson y Powell 2006, Brett y col. 2014)*. El índice de "eficiencia placentaria", definido como el cociente entre el peso fetal y el peso placentario brinda información acerca de la capacidad de la placenta de proveer sustento para el crecimiento fetal. Un cociente alto se asocia a una incrementada transferencia de nutrientes y normal o gran crecimiento fetal, mientras que un cociente bajo se asocia a una deficiencia en la capacidad de transporte de nutrientes placentario y retraso del crecimiento intrauterino *(Fowden y col. 2009, Hayward y col. 2016)*.

3. LOS LÍPIDOS

3.1. ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y METABOLISMO

Los lípidos son uno de los sustentos metabólicos para el desarrollo fetal y la vida. Son moléculas orgánicas de estructura diversa cuya característica en común es su insolubilidad en líquidos acuosos y su solubilidad en solventes orgánicos. Son componentes estructurales de la membrana celular y de las membranas de las organelas celulares, pueden formar parte de la vaina que envuelve a las células nerviosas, constituir la reserva celular para la obtención de energía a largo plazo, funcionar como cofactores enzimáticos y moléculas de señalización inter e intracelulares y ser precursores para la síntesis de hormonas *(Feingold 2000)*.

La insolubilidad en líquidos acuosos otorga dificultad al transporte lipídico en los fluidos biológicos, por lo que se los encuentra unidos a proteínas o formando parte de lipoproteínas. La síntesis, el transporte, el destino y la degradación de lípidos son modulados por diversas hormonas en función de la ingesta y las necesidades del organismo.

Los lípidos pueden clasificarse en función de su polaridad como lípidos neutros o lípidos polares:

Lípidos neutros: Los *ácidos grasos* son moléculas orgánicas formadas por una larga cadena hidrocarbonada de número par de átomos de carbono en cuyo extremo hay un grupo carboxilo. Los ácidos grasos que se consumen en la dieta incluyen ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Los PUFA tienen más de un doble enlace y son clasificados en base a su estructura química, siendo esenciales en el desarrollo los omega-3 (n-3), omega-6 (n-6) y omega-9 (n-9). El ácido araquidónico (n-6) y el ácido docosahexaenoico (n-3) son absolutamente necesarios para numerosos procesos, incluyendo el crecimiento, la reproducción, la visión y el desarrollo del cerebro *(Gurr y col. 2002)*. Es por ello, que estos ácidos grasos o sus precursores, el ácido linoleico y el ácido linolénico respectivamente, necesitan ser incorporados mediante la dieta. Por otro lado, los ácidos grasos saturados son moléculas de alto contenido energético que estimulan vías pro-inflamatorias a través de la activación de los TLRs *(Holzer y col. 2011)*. Los ácidos grasos se encuentran dentro de la célula esterificados en su mayor parte en triglicéridos o ésteres de coleterol, y en circulación unidos a proteínas transportadoras como por ejemplo la albúmina y las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP). En la circulación fetal, los ácidos grasos se encuentran unidos a alfa feto proteínas *(Gitlin 1975)*.

Los triglicéridos (Tg) están conformados por tres ácidos grasos esterificados a cada uno de los grupos hidroxilos del glicerol. Constituyen una fuente de reserva energética importante ya que la oxidación de los triglicéridos libera una gran cantidad de energía. Dada la naturaleza apolar de sus componentes, se almacenan en gotas lipídicas intracelulares y se transportan formando parte de macromoléculas más grandes, las lipoproteínas (HDL, VLDL y LDL).

El *colesterol* es miembro del grupo de esteroides que posee un sistema de anillo tetracíclico y no presenta ácidos grasos en su composición. También es almacenado en gotas lipídicas y transportado formando parte de lipoproteínas (HDL, VLDL y LDL). Su presencia modula la fluidez de las membranas biológicas, brindando soporte estructural a las mismas. Es el precursor de la mayoría de las hormonas esteroideas. Su disponibilidad y metabolismo es fundamental para la producción de hormonas responsables del reordenamiento metabólico que asegura el mantenimiento de la preñez, la nutrición fetal y el desarrollo embrionario *(Minsker y col. 1983, Repetto y col. 1990)*.

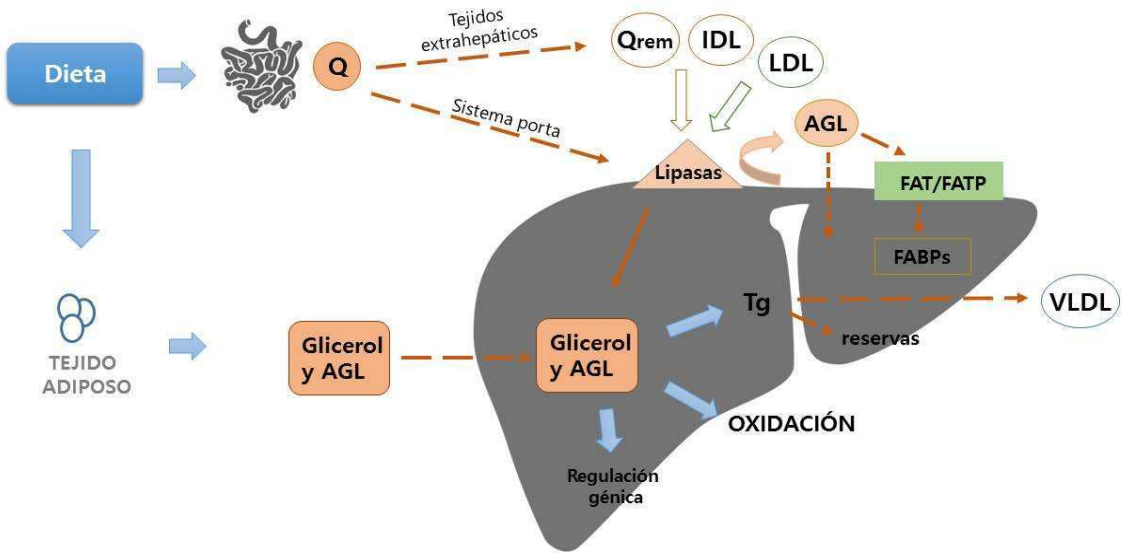
Los *ésteres de colesterol* son ácidos grasos esterificados a una molécula de colesterol. Son también componentes estructurales de las membranas celulares y reservorios de ácidos grasos y de colesterol en gotas lipídicas en el interior de la célula.

Lípidos polares: Los componentes mayoritarios de las membranas celulares son los *fosfolípidos*, lípidos que se componen de una molécula de glicerol que esterifica dos ácidos grasos, y un ácido fosfórico que esterifica a otro compuesto, generalmente una base orgánica (colina, serina, inositol o etanolamina). De esta manera, la fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina que conforman las bicapas lipídicas de las membranas celulares se sitúan en la porción expuesta al citosol o al medio extracelular. De acuerdo a las cantidades relativas de estos fosfolípidos y de otros componentes se definen las características y funciones de las membranas como la fluidez, la permeabilidad, el potencial eléctrico y la capacidad de transmitir señales, entre otras. Los fosfolípidos de las membranas trofoblásticas, específicamente la fosfatidilserina, están involucrados en el proceso de fusión celular y formación de sincicios. Dada su participación en la formación de nuevas estructuras celulares, los fosfolípidos juegan un papel fundamental durante la organogénesis *(Adler y col. 1995)*.

Adquisición de lípidos dietarios

Los lípidos provenientes de la dieta son hidrolizados en moléculas simples en el lumen del intestino durante el proceso de absorción e ingresan a la circulación plasmática en forma de quilomicrones (Q), lipoproteínas originadas en las células de la mucosa del intestino. Cuando alcanzan la circulación, la mayoría de los Q se dirigen hacia el hígado a través del sistema porta,

mientras que una proporción de Q se dirige hacia los tejidos extrahepáticos, donde la enzima lipoproteína lipasa (LPL) hidroliza los triglicéridos contenidos dentro de los Q liberando ácidos grasos y dando origen a Q remanentes (Q rem) y lipoproteínas de densidad intermedia y baja (IDL y LDL) (**Esquema 3**) *(Redgrave 1970, Brett y col. 2014).*



Esquema 3: Adquisición de lípidos dietarios, transporte y utilización de ácidos grasos. Q: quilomicrones; Q rem: quilomicrones remanentes; IDL: lipoproteína de densidad intermedia; LDL: lipoproteína de baja densidad VLDL: lipoproteína de muy baja densidad; Tg: triglicéridos, AGL: ácidos grasos libres; FATP: proteínas transportados de ácidos grasos; FAT: proteínas translocasas de ácidos grasos; FABP: proteínas de unión a ácidos grasos.

Transporte y utilización de ácidos grasos

Los ácidos grasos adquiridos mediante la dieta o como resultado de la hidrólisis del tejido adiposo son transportados en la circulación unidos a la albúmina plasmática o vehiculizados en las lipoproteínas formando parte de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol. Son incorporados en los hepatocitos a través de difusión, como resultado de un proceso mediado por proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP) o translocasas de ácidos grasos (FAT) como la CD36 *(Abumrad y col. 1999, Kazantzis y Stahl 2012)* o como resultado de una combinación de estos procesos (**Esquema 3**) *(Sampath y Ntambi 2005, Nguyen y col. 2008).* En el compartimento intracelular los ácidos grasos se unen a la coenzima A (CoA), proceso catalizado por la enzima acil-CoA sintasa hepática (ACSL) que se encuentra anclada en la membrana celular. Una de las condiciones requeridas para que los ácidos grasos participen en las diferentes vías metabólicas es la formación de acil-CoA-tioésteres (acil-CoA). Posteriormente, el acil-CoA se une la proteína

citosólica FABP (proteína de unión a ácidos grasos), lo cual facilita su solubilización y posibilita su transporte a los diferentes compartimentos celulares *(Chmurzynska 2006, Storch y Corsico 2008)*. Alternativamente, los acil-CoA pueden ser incorporados en lípidos más complejos como los triglicéridos y fosfolípidos, ser oxidados en las mitocondrias y peroxisomas o desencadenar efectos sobre la regulación génica y vías de señalización *(Nguyen y col. 2008, Rui 2014)*.

Síntesis de ácidos grasos y triglicéridos

La biosíntesis de ácidos grasos (lipogénesis) se lleva a cabo en el citoplasma de todas las células a partir de acetil-CoA, ATP y el poder reductor del NADPH proveniente del ciclo de las pentosas fosfato y otros sistemas generadores. El acetil-CoA puede provenir de la glucólisis, de la degradación de aminoácidos o de las reservas de triglicéridos del propio tejido *(Desvergne y col. 2006)*. Actualmente se sabe que algunos lípidos son almacenados en gotas lipídicas, unidades especializadas consideradas depósitos de lípidos neutros intracelulares. Además de su función de reservorio energético, las gotas lipídicas son fuente de lípidos para la biosíntesis de membranas y almacenan lípidos potencialmente tóxicos para las células *(Ducharme y Bickel 2008, Fujimoto y Parton 2011)*.

La síntesis de triglicéridos tiene lugar en el retículo endoplásmico de la mayoría de las células del organismo, pero es en particular en los hepatocitos y en los adipocitos donde este proceso es más activo y de mayor relevancia metabólica. En el hígado, la síntesis de triglicéridos se encuentra conectada a la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). No se considera a este órgano como un sitio de almacenamiento fisiológico de lípidos, sino como un órgano de distribución de los mismos *(Lewis 1997, Lewis y col. 2002)*.

Oxidación de ácidos grasos

El primer paso de la β-oxidación de los ácidos grasos es su activación mediante su conversión a tioésteres de coenzima A (acil-CoA), catalizada por la Acil-Coa sintasa. Luego, los ácidos grasos de cadena corta son transportados directamente a la matriz mitocondrial, mientras que los de cadena larga necesitan ser conjugados a carnitina para poder atravesar la membrana mitocondrial interna. Esta conjugación es catalizada por la carnitina palminoil transferasa 1 (CPT1), enzima que se encuentra unida a la membrana mitocondrial externa *(Coleman y col. 2000, Ryu y Cha 2003, Nguyen y col. 2008)*. Dentro de la matriz mitocondrial se lleva a cabo la β-oxidación, donde las moléculas de acil-CoA son degradadas por una secuencia de reacciones de oxidación, hidratación y tiólisis. En la oxidación de ácidos grasos saturados intervienen además enzimas isomerasas y reductasas encargadas de reducir los dobles enlaces. La actividad de CPT1 se

encuentra disminuida en el estado post-prandial, mientras que aumenta en ayunas. Los incrementados niveles de malonil-CoA provenientes de la actividad de la acil-CoA carboxilasa (ACC, enzima clave en la síntesis de los ácidos grasos) inhiben la actividad de CPT1, disminuyendo la entrada de ácidos grasos al compartimento mitocondrial y en consecuencia la β-oxidación *(McGarry y col. 1977, Stefanovic-Racic y col. 2008)*. La oxidación de ácidos grasos también tiene lugar en los peroxisomas *(Mannaerts y col. 2000)*. El paso limitante de este proceso está determinado por la acción de la enzima acil-CoA oxidasa (ACO). Existe una selectividad diferente en cuanto a la clase de ácido graso que es oxidado en la mitocondria y en los peroxisomas, los ácidos grasos de cadenas muy largas comienzan su oxidación preferentemente en los peroxisomas y la finalizan en las mitocondrias, indicando una conexión entre ambas organelas *(Schumann y Subramani 2008, Demarquoy y Le Borgne 2015)*.

3.2. METABOLISMO LIPÍDICO EN LA GESTACIÓN

A comienzos y hasta mediados de la gestación el cuerpo materno acumula grasa, que luego será utilizada por el feto para su crecimiento y desarrollo. Este proceso fisiológico, que se evidencia tanto en mujeres como en modelos experimentales, es consecuencia de la hiperfagia y del aumento de la síntesis de lípidos por parte del tejido adiposo debido a una mayor respuesta a insulina *(King y col. 1994, Herrera y col. 2006)*. En efecto, tratamientos *in vivo* en ratas preñadas han demostrado que los principales componentes lipídicos de las dietas representan el principal componente lipídico del tejido adiposo materno, demostrando una eficiente acumulación de ácidos grasos en el tejido adiposo materno durante la gestación temprana y que la composición de los ácidos grasos dietarios maternos influye en la composición del tejido adiposo y del plasma materno y fetal *(Sohlstrom y col. 1994, Amusquivar y Herrera 2003)*.

Hacia el final de la gestación se produce un estado de insulino resistencia fisiológico que conduce al metabolismo lipídico materno hacia una condición catabólica *(Lopez-Luna y col. 1986)*. Se produce una disminución de la actividad de la lipoproteina lipasa (LPL) en el tejido adiposo, disminuyendo la incorporación de triglicéridos desde la circulación. Además, se produce un aumento de la actividad lipolítica del adipocito, con la consecuente liberación de ácidos grasos no esterificados y glicerol a la circulación. Estas moléculas son incorporadas en el hígado, donde pueden ser re-esterificadas a triglicéridos que son luego liberados a la circulación formando parte de las VLDL. Los triglicéridos de las VLDL son hidrolizados en la membrana del trofoblasto y los ácidos grasos liberados son captados por la placenta *(Duttaroy 2009, Brett y col. 2014)*. Parte de los ácidos grasos que son captados por el hígado son oxidados en los hepatocitos, proporcionando

energía metabólica y la producción de cuerpos cetónicos, que luego son liberados a la circulación y captados por la placenta. Estos caminos metabólicos se encuentran incrementados desde mediados de la gestación, conduciendo a la hiperlipidemia materna y facilitando la nutrición fetal y el rápido crecimiento y acumulación lipídica que el feto requiere en esta etapa del desarrollo *(Herrera y col. 2006)*.

Durante la gestación también se observa un aumento en los niveles de leptina en circulación materna como consecuencia de su producción por parte de la placenta y del tejido adiposo *(Chien y col. 1997, Hauguel-de Mouzon y col. 2006, Henson y Castracane 2006)*. Los elevados niveles de la hormona contribuyen con la hiperlipidemia materna a través del estímulo del catabolismo lipídico en la periferia *(Muoio y Lynis Dohm 2002, Ceddia 2005)*. Por otro lado, durante la gestación se observa hiperfagia materna debido al desarrollo de resistencia a la leptina a nivel del sistema nervioso central *(Ladyman y col. 2012)*.

Transporte placentario de lípidos

Una de las principales moléculas lipídicas que recibe el feto son los ácidos grasos. Cuando los mismos están en circulación en su forma libre (unidos a albúmina), pueden atravesar la barrera placentaria por difusión simple (a favor del gradiente de concentración que existe para la mayoría de los ácidos grasos libres) o en forma facilitada por proteínas transportadoras de ácidos grasos presentes en la placenta humana y de rata *(Campbell y col. 1994, Crabtree y col. 1998, Knipp y col. 2000)*. Sin embargo, la mayor parte de los lípidos en circulación materna son triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol que se encuentran formando parte de lipoproteínas originadas en el intestino (quilomicrones) o en el hígado (principalmente en las lipoproteínas de baja densidad, VLDL). La placenta posee múltiples receptores y enzimas que le permiten metabolizar las lipoproteínas de circulación materna e incorporar su contenido. Entre ellas se encuentran las enzimas lipoproteína lipasa (LPL) y lipasa endotelial (LE), que, acopladas a receptores de lipoproteínas, hidrolizan los triglicéridos de las lipoproteínas hacia ácidos grasos *(Lindegaard y col. 2005, Duttaroy 2009)*. Una vez que los ácidos grasos son hidrolizados, se encuentran disponibles para ser incorporados por la placenta. Algunos pueden atravesar la placenta por difusión simple, mientras que otros son transportados al interior del trofoblasto por transportadores de ácidos grasos (FATP) y translocasas de ácidos grasos (FAT/CD36) *(Cunningham y McDermott 2009, Kazantzis y Stahl 2012)*. Las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) se localizan en el citoplasma y son las responsables del transporte de los ácidos grasos a través de citosol hasta los sitios donde serán oxidados ó esterificados. La placenta cuenta con todas las enzimas necesarias para reesterificar los ácidos grasos liberados luego de la hidrólisis y acumularlos en forma transiente en las células

trofoblásticas. Dichos lípidos pueden ser utilizados por la placenta como fuente de energía o ser nuevamente hidrolizados para la obtención de los ácidos grasos que son transferidos a circulación fetal (donde estarán en forma de ácidos grasos libres o formando parte de lipoproteínas fetales) *(Cunningham y McDermott 2009, Diaz y col. 2014)*. Como se ha mencionado, la expresión y la actividad de las proteínas implicadas en el transporte de ácidos grasos se encuentran reguladas por la insulina, el IGF-1 y la leptina *(Magnusson-Olsson y col. 2006, Mousiolis y col. 2012)*.

4. LA INSULINA

4.1. SÍNTESIS Y REGULACIÓN

La insulina es una hormona proteica crucial en el metabolismo de la glucosa. Es sintetizada en las células-β de los islotes de Langerhans en el páncreas como una pre-hormona. Su secreción es estimulada principalmente por los niveles de glucosa en circulación y su producción es regulada por numerosas hormonas. Un aumento en los niveles de las hormonas de crecimiento, lactógeno placentario, estrógenos y progestágenos induce la secreción de insulina, mientras que la leptina posee efectos inhibitorios sobre la secreción de insulina *(Desvergne y col. 2006, Niswender y Magnuson 2007).*

4.2. FUNCIONES

Durante el estado postprandial, la secreción de insulina controla la homeostasis metabólica mediante la promoción de procesos anabólicos en numerosos tejidos. Estimula la entrada de glucosa en músculo y tejido adiposo (promoviendo la translocación de GLUT4 a la membrana), la síntesis de proteínas y de glucógeno en el músculo y el hígado, la síntesis de lípidos y su almacenamiento en el hígado y el tejido adiposo, mientras que posee efectos inhibitorios respecto a la oxidación de ácidos grasos, glucogenolisis, gluconeogénesis, apoptosis y autofagia *(Desvergne y col. 2006).* Durante el estado de ayuno la secreción de insulina disminuye y el efecto de hormonas hiperglucemiantes como el glucagon favorece la utilización de los ácidos grasos en el hígado y el tejido adiposo para la generación de ATP y el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa *(Randle 1986, Desvergne y col. 2006).* Además, la insulina estimula el crecimiento celular, función en común con los factores de crecimiento similares a la insulina 1 y 2 (IGF1 y 2) *(Desvergne y col. 2006, Hiden y col. 2009).*

La insulina induce el crecimiento fetal principalmente mediante la estimulación del transporte placentario de glucosa y áminoácidos *(Acosta y col. 2015, Rosario y col. 2016).* Además, existen evidencias que muestran que la insulina también estimula el transporte de lípidos *(Magnusson-Olsson y col. 2006, Softic y col. 2012).* En el tejido adiposo, la insulina estimula la actividad de la LPL, lo que resulta en la liberación de ácidos grasos de las lipoproteínas, que son incorporados por los adipocitos y almacenados en forma de triglicéridos *(Choi y col. 2010).* A nivel hipotalámico, la insulina regula el peso corporal y la homeostasis de la glucosa *(Bruning y col. 2000,*

Taguchi y col. 2007). A nivel del endotelio la insulina posee efectos vasodilatadores mediados por la estimulación de la producción de ON por parte del endotelio *(Hiden y col. 2009, Guo 2014).*

4.3. RECEPTOR Y SEÑALIZACIÓN

- Receptor

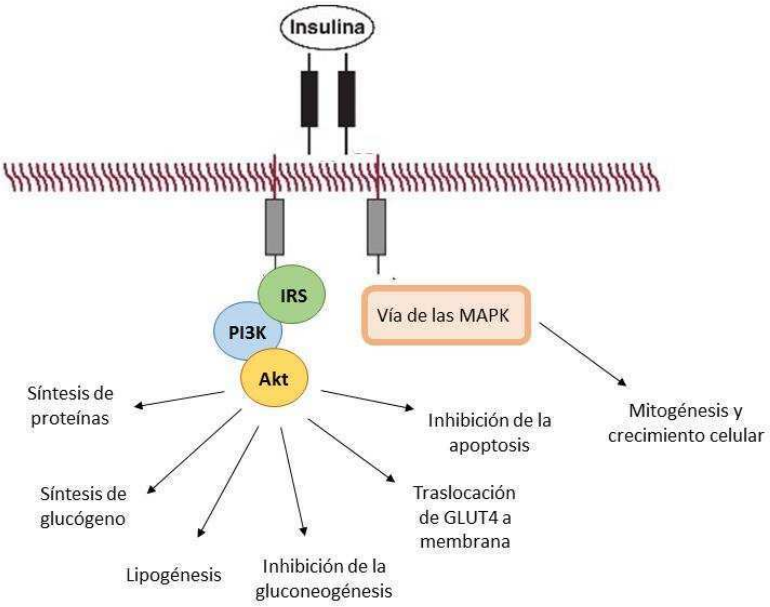
El receptor de insulina (RI) es una glicoproteína que consiste en una subunidad extracelular α (135 kDa) y subunidad una transmembrana β (95 kDa) que forman homodímeros en respuesta a la unión de la hormona. Existen dos isoformas del RI resultantes del splicing alternativo del exón 11 (correspondiente a 12 aminoácidos situados en el carboxilo terminal de la subunidad α): IRA o isoforma corta (no posee el exón 11) e IRB o isoforma larga (posee el exón 11) *(Seino y Bell 1989, Mosthaf y col. 1990).* La abundancia relativa de las isoformas muestra especificidad de tejido en la rata y en el humano y se encuentra regulada durante el desarrollo y la diferenciación celular *(Moller y col. 1989, Mosthaf y col. 1990).* Si bien ambas isoformas inducen los efectos mitogénicos y metabólicos de la insulina *(Yamaguchi y col. 1991)*, IRA predomina en tejidos fetales y altamente proliferativos y se encuentra involucrada principalmente en la señalización de procesos de proliferación y sobrevida celular, mientras que IRB se asocia a los efectos metabólicos de la insulina *(Yamaguchi y col. 1993, Frasca y col. 1999).* Las dos isoformas presentan diferencias sutiles en cuanto a la activación y la señalización, sin embargo, además de su afinidad por la insulina, IRA presenta alta afinidad por IGF2 y baja afinidad por IGF1, moléculas inductoras del crecimiento cellular *(LeRoith y col. 1995, Frasca y col. 1999, Hiden y col. 2009).* Debido a la alta homología entre el receptor de insulina y el receptor de IGF1 (IGFR1), estas moléculas pueden formar receptores híbridos que unen insulina e IGF1 *(Czech 1982, Pandini y col. 2002, Belfiore y col. 2009).* Además, si bien con baja afinidad, la insulina puede señalizar a través de su unión a IGFR1 en condiciones de hiperinulinemia *(Baumann y col. 2014).*

- Señalización

La unión de la insulina a su receptor resulta en la autofosforilación del receptor en tirosina y en la consecuente fosforilación de residuos de tirosina presentes en diversas moléculas como las proteínas tirosinas fosfatasa con dominio SH2 (SHP2) y los sustratos del receptor de insulina (IRS). Esto conduce al reclutamiento de proteínas río abajo de la cascada de señalización y a la activación de las dos principales vías de acción de insulina: la vía de las proteínas kinasas activadas por

mitógenos (MAPK) y la vía PI3K/Akt *(Guo 2014)* (**Esquema 4**). La vía de las MAPK es la encargada de mediar los efectos de la hormona sobre la mitogénesis y el crecimiento celular, mientras que la vía PI3K/Akt media los efectos de la hormona sobre el metabolismo de nutrientes y sobre la sobrevida celular *(Guo 2014)*. Akt activa a mTOR (blanco de rapamicina en células de mamífero) estimulando así la síntesis de proteínas *(Sengupta y col. 2010)*. Además, Akt media el efecto de la insulina sobre la supresión de la producción de glucosa hepática *(Battiprolu y col. 2012)*. Otros efectos de Akt son la activación de la glucógeno sintasa y la consecuente estimulación de la síntesis de glucógeno, la traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática, la inhibición de la apoptosis y la disminución de cAMP vía activación de fosfodiesterasas *(Guo 2014)*.

La capacidad de la insulina de activar la lipogénesis está mediada por la regulación positiva de SREBP1 (Proteína de Unión al Elemento de Respuesta a los Esteroles) también a través de la activación de Akt *(Foretz y col. 1999, Yecies y col. 2011)*. El factor SREBP1 activa la transcripción de los genes involucrados en la lipogénesis, induciendo la síntesis de lípidos y colesterol *(Horton y col. 2002, Horton y col. 2003)*. Además, la activación de la ACC por la insulina induce un aumento de los niveles de malonil CoA, lo que resulta en la inhibición de la CPT1 y por lo tanto una disminución de la β-oxidación mitocondrial de ácidos grasos *(McGarry y col. 1977, Horton y col. 2003)*. SREBP1 activa a PPARγ (receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales gama), factor de transcripción que induce la diferenciación de adipocitos y regula la transcripción de numerosos genes involucrados en la incorporación, almacenamiento y síntesis de lípidos como la ACC, la lipoproteína lipasa (LPL) y las proteínas de unión y translocación de ácidos grasos (FABP y CD36) *(Berger y Moller 2002)*. PPARγ se expresa principalmente en tejido adiposo y en menor abundancia en músculo e hígado y puede ser activado por una variedad de ligandos incluyendo ácidos grasos, prostaglandinas y leucotrienos *(Gavrilova y col. 2003)*.



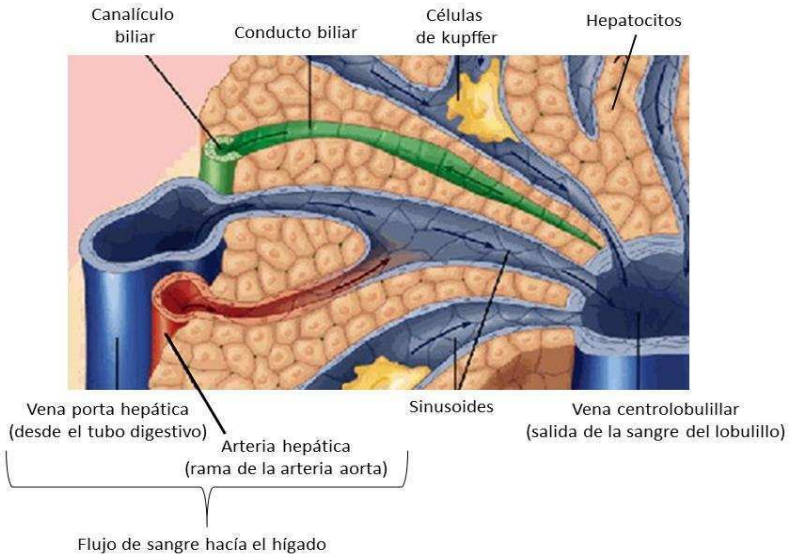
Esquema 4: Principales vías de señalización de la insulina.

5. El HÍGADO

5.1. CARACTERÍSTICAS

La respuesta metabólica a los períodos de ayuno y a la ingesta se encuentra regulada por una serie de interacciones complejas en las que intervienen varios órganos y las cuales se encuentran coordinadas por el hígado.

El hígado recibe sangre a través de la vena porta procedente del tubo digestivo y de la arteria hepática, rama de la arteria aorta. El lobulillo hepático, unidad funcional del hígado, está formado por dobles cordones de hepatocitos en disposición radiada. Entre ellos se encuentra el canalículo biliar, en el cual los hepatocitos vierten la bilis que es conducida hacia el conducto biliar. De la rama de la vena porta y de la arteria hepática surgen finas ramas que se fusionan formando los capilares hepáticos, llamados sinusoides. De esta sangre los hepatocitos absorben nutrientes y oxígeno, y en ella vierten los productos resultantes del metabolismo celular. La sangre sinusoidal sale del lobulillo a través la vena centrolubulillar *(Malarkey y col. 2005)* (**Esquema 5**).



Esquema 5: Lobulillo hepático.

Las principales funciones desempeñadas por el hígado pueden agruparse en tres categorías: a) función de síntesis: de glucógeno, lípidos (colesterol, ácidos grasos y triglicéridos), proteínas (síntesis de albúmina y proteínas Apo que formarán las lipoproteínas), factores de coagulación y

bilis; b) función de almacenamiento: vitaminas liposolubles y glucosa en forma de glucógeno; y c) función de detoxificación *(Rui 2014)*.

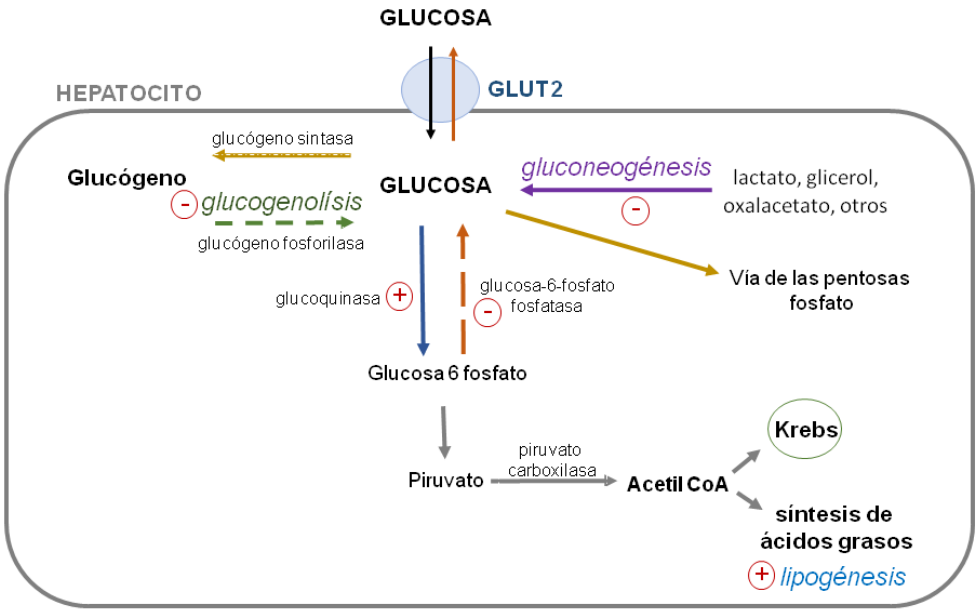
5.2. METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO

El hígado contribuye ampliamente a los niveles de glucosa circulante. Funciona como el principal "órgano tampón" capaz de proveer glucosa al organismo cuando los nutrientes escasean y almacenar glucosa como glucógeno cuando los alimentos abundan. El **Esquema 6** resume las principales vías metabólicas de la glucosa en el tejido hepático. La glucosa plasmática ingresa al hepatocito por difusión facilitada principalmente a través del transportador GLUT2. Luego, es rápidamente fosforilada a glucosa-6-fosfato por acción de la enzima glucoquinasa. La glucosa-6-fosfato puede seguir diferentes vías, pudiendo ser: a) desfosforilada por medio de la enzima glucosa-6-fosfato-fosfatasa y de esta manera pasar a circulación periférica como glucosa libre; b) degradada mediante glucólisis anaerobia hasta piruvato y lactato, a su vez el piruvato puede convertirse en acetil-CoA vía complejo piruvato dehidrogenasa en la mitocondria y de allí continuar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y fosforilación oxidativa, proporcionando energía a la célula hepática; c) el acetil-CoA puede ser además convertido en citrato en el interior mitocondrial, y este citrato en el citosol transformarse nuevamente a acetil-CoA para ser utilizado como sustrato para la síntesis de ácidos grasos (lipogénesis); d) utilizada para la obtención de equivalentes de reducción por medio de la vía de las pentosas fosfato; o e) transformada en glucógeno hepático mediante la acción de la glucógeno sintasa. Las enzimas glucoquinasa y glucosa-6-fosfato-fosfatasa, las cuales catalizan el primer y último paso de la utilización y producción de glucosa respectivamente, poseen un rol clave en la homeostasis de la glucosa, y su transcripción y actividad se encuentra regulada por la acción de la insulina de forma positiva y negativa respectivamente *(Desvergne y col. 2006, Rui 2014)*.

El metabolismo del glucógeno está controlado por las actividades de las enzimas glucógeno fosforilasa (enzima clave en la degradación del glucógeno) y glucógeno sintasa y por cambios en el equilibrio hormonal. La activación de la glucógeno fosforilasa está regulada de manera positiva por el glucagon, las catecolaminas, la adrenalina y la noradrenalina y es inhibida por la insulina y la glucosa *(Barthel y Schmoll 2003, Postic y col. 2004)*.

La salida neta de glucosa es el resultado de dos vías que ocurren simultáneamente y que están altamente reguladas como la glucogenolisis (hidrólisis de glucógeno, llevada a cabo por la enzima glucógeno fosforilasa) y la gluconeogénesis (síntesis de glucosa a partir de lactato, glicerol y oxalacetato, entre otros) *(Postic y col. 2004)*. La insulina es capaz de inhibir ambas vías impidiendo

la liberación de glucosa hepática mientras que el glucagon y los glucocorticoides estimulan la producción y liberación de glucosa.



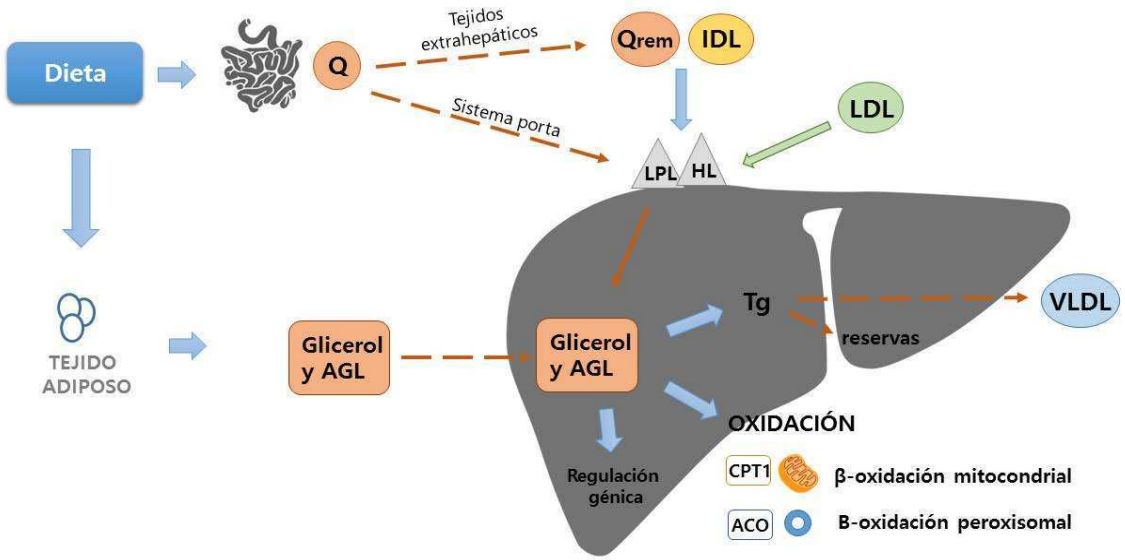
Esquema 6: Principales vías del metabolismo hepático de la glucosa. El círculo rojo señala el tipo de regulación que la insulina ejerce sobre la vía o enzima.

5.3. METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS

El hígado tiene la capacidad de sintetizar lípidos y de metabolizar aquéllos que arriban al hepatocito. Tanto los ácidos grasos libres, transportados por la albúmina, como los triglicéridos, colesterol y fosfolípidos, transportados en lipoproteínas de la circulación, son captados por este órgano y pueden ser direccionados a diferentes vías metabólicas según las necesidades fisiológicas del organismo *(Rui 2014)*.

El hígado recibe desde la circulación los lípidos transportados por los quilomicrones que provienen del intestino y aquellos quilomicrones que fueron parcialmente hidrolizados en tejidos extrahepáticos. También arriban al hígado desde la circulación las lipoproteínas IDL y LDL y los ácidos grasos libres provenientes de la lipólisis del tejido adiposo *(Nguyen y col. 2008)* (**Esquema 7**). Los lípidos contenidos dentro de las lipoproteínas son incorporados a los hepatocitos luego de su hidrólisis mediada por lipasas. La lipasa hepática es una enzima sintetizada por el hepatocito y localizada en la superficie de los capilares sinusoidales que puede considerarse como una lipasa del compartimento vascular y comparte numerosas similitudes estructurales y funcionales con la LPL de los tejidos extrahepáticos. La lipasa hepática no solo hidroliza triglicéridos y fosfolípidos presentes en las lipoproteínas, sino que además sirve como ligando de receptores celulares y proteoglicanos,

facilitando su captación. La LPL hidroliza los triglicéridos de los Q y de las VLDL. Si bien se expresa principalmente en tejido adiposo y músculo, también se localiza en el hígado, donde posee un patrón de regulación diferente. En roedores, la actividad de la LPL se encuentra elevada durante las etapas embrionarias y postnatales tempranas, cumpliendo una función fundamental en el desvío de triglicéridos desde la circulación hacia el hígado para proporcionar más energía *(Merkel y col. 1998)*. Si bien su expresión disminuye rápidamente durante las primeras semanas posteriores al nacimiento, encontrándose sólo en algunas células de Kupffer *(Camps y col. 1991)*, se ha visto que la LPL es fisiológicamente activa en el hígado adulto y se encuentra críticamente involucrada en la regulación del metabolismo lipídico. De hecho, su sobreexpresión hepática conduce a un aumento de dos veces en el contenido de triglicéridos y resistencia a la insulina en ratones y humanos *(Kim y col. 2001, Pardina y col. 2009)*. Una vez incorporados en el hígado, los ácidos grasos pueden ser esterificados en lípidos más complejos como los triglicéridos y fosfolípidos, ser oxidados en la mitocondria y peroxisomas o desencadenar efectos sobre la regulación génica y vías de señalización *(Nguyen y col. 2008)* (**Esquema 7**). El balance entre la oxidación y la esterificación de los ácidos grasos en el hígado está controlado principalmente por los cambios nutricionales, los niveles de las hormonas como la insulina, el glucagon y la leptina entre otras, y la expresión y actividad de enzimas involucradas en estos procesos.



Esquema 7: Principales vías de incorporación y metabolismo de lípidos hepáticos. ACO: acil-Coa oxidasa de ácidos grasos; CPT1: carnitina palmitoil transferasa 1; Q: quilomicrones; Q rem: quilomicrones remanentes; IDL: lipoproteína de densidad intermedia; LDL: lipoproteína de baja densidad VLDL: lipoproteína de muy baja densidad; LPL: lipoproteína lipasa; HL: lipasa hepática. Tg: triglicéridos, AGL: ácidos grasos libres.

Síntesis hepática de lípidos

El hígado puede hacer síntesis *de novo* de ácidos grasos (lipogénesis) a partir de sustratos no lipídicos (principalmente glucosa y aminoácidos) que son transformados en primera instancia a acetil-CoA. Luego, la acetil-CoA carboxilasa (ACC) cataliza la carboxilación del acetil-CoA en malonil-CoA y posteriormente la sintasa de ácidos grasos (FAS) descarboxila el malonil formando el ácido graso palmítico (C16:0), proceso que es estimulado por la insulina e inhibido por el ayuno, el glucagon y la adrenalina *(Nguyen y col. 2008)*. El ácido graso palmítico puede ser desaturado dando como resultado ácido palmitoleico, o elongado dando como resultado la formación inicial de ácido esteárico (C18:0) que a su vez puede ser desaturado formando ácido oleico (C18:1) *(Sampath y Ntambi 2005)*. Uno de los principales reguladores de la síntesis de ácidos grasos es la insulina, que a través de la activación de la proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroles 1 (SREBP1) induce la expresión de numerosos genes involucrados en la síntesis, transporte y almacenamiento de lípidos, entre los que se encuentra PPARγ *(Horton y col. 2002)*. Otro factor clave en la regulación de la lipogénesis es la proteína ChREBP (elemento de respuesta a carbohidratos), factor de transcripción inducido por la glucosa que activa genes involucrados en la lipogénesis y la glucólisis *(Rui 2014)* .

Finalmente, los ácidos grasos sintetizados en forma endógena o los que arriban al tejido a través de la circulación son esterificados en fosfolípidos, triglicéridos y/o ésteres de colesterol. Para ello, son activados a acil-CoA por la enzima acil-CoA sintasa en el camino que conduce a la síntesis de triglicéridos, proceso catalizado por las enzimas: glicerol-3-fosfato-aciltransferasa, 1-acilglicerol-3-fosfato-aciltransferasa, fosfatidato fosfohidrolasa y diacilglicerol-aciltransferasa (DAGT) *(Nguyen y col. 2008, Postic y Girard 2008)*. La síntesis de triglicéridos hepática se encuentra ligada a la síntesis y secreción de VLDL, que constituye el vehículo de transporte de los triglicéridos endógenos sintetizados desde el hígado hacia los tejidos extrahepáticos. La formación de las lipoproteínas comprende la incorporación de proteínas apo en la estructura de la lipoproteína, que una vez madura migra hacia la membrana sinusoidal del hepatocito fusionándose con ella para ser secretadas por pinocitosis inversa a la circulación como moléculas de VLDL nacientes *(Lewis 1997, Nguyen y col. 2008)*.

La velocidad de liberación de las VLDL hepática se encuentra regulada por el estado nutricional y hormonal del organismo, el cual modula los caminos de oxidación, almacenamiento o secreción de ácidos grasos. Ante una situación de insulino resistencia y/o alta disponibilidad de nutrientes, en presencia de una incrementada disponibilidad hepática de ácidos grasos y una mayor lipogénesis, los hepatocitos priorizan el camino de esterificación de los ácidos grasos con el consecuente aumento de secreción de VLDL-triglicéridos *(Lewis 1997, Lewis y col. 2002)*. En

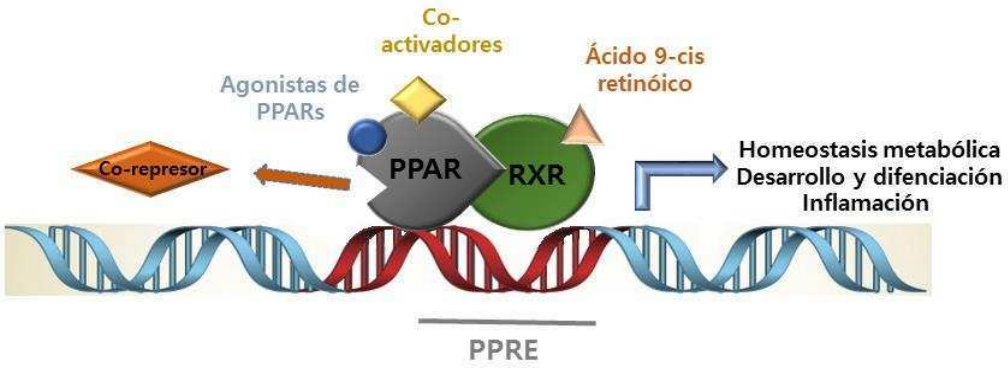
ciertas condiciones metabólicas, relacionadas con un alto índice de oxidación de ácidos grasos, el hígado produce cantidades considerables de cuerpos cetónicos que son exportados a la circulación. Los cuerpos cetónicos son utilizados como fuente de energía por los tejidos extrahepáticos entre los cuales se encuentra la placenta *(McGarry y col. 1975, Herrera 2002)*.

Oxidación hepática de lídipos

El hígado incorpora y oxida o almacena los lípidos de la circulación contribuyendo a evitar los efectos adversos debidos a la hiperlipidemia y a la lipotoxicidad en el resto de los tejidos del organismo. La oxidación de ácidos grasos en los hepacitos se lleva a cabo en la mitocondrias y peroxisomas, siendo un factor clave en este proceso el receptor activado por proliferadores peroxisomales alfa (PPARα).

Los **PPAR** son miembros de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas. Son factores de transcripción activados por ligando que regulan la expresión de genes implicados en la homeostasis lipídica y en los procesos fisiopatológicos que subyacen en la sensibilidad a la insulina y a la regulación de procesos inflamatorios *(Wahli y Michalik 2012)*. Hasta ahora se han identificado tres isotipos del receptor: PPARα, PPAR β/δ y PPARγ. Sus secuencias se encuentran altamente conservadas entre especies, existiendo más de un 80% de homología entre el ratón, la rata y el humano *(Kersten y Wahli 2000, Lewis y col. 2002)*. Cada isotipo presenta un patrón de expresión y funciones diferenciales en los diferentes tejidos del organismo *(Berger y Moller 2002, Hihi y col. 2002)*. Las tres isoformas de PPAR funcionan como sensores de ácidos grasos, regulando la homeostasis metabólica celular *(Berger y Moller 2002, Desvergne y col. 2006)*.

PPARα heterodimeriza con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) y se une a regiones específicas PPRE (elementos de respuesta a PPAR) en el promotor de sus genes blanco. La activación de PPARα se produce ante la unión del ligando, que induce un cambio conformacional en la estructura proteica que permite la disociación de proteínas co-represoras y la asociación con proteínas co-activadoras *(Berger y Moller 2002)* (**Esquema 8**).



Esquema 8: Principal vía de activación de los PPAR. Los heterodímeros PPAR-RXR se unen a regiones PPRE (elementos de respuesta a PPAR) localizadas en el promotor de genes blanco. La unión del ligando induce un cambio conformacional en el PPAR que permite su disociación de factores co-represores y el reclutamiento de factores co-activadores que activan la transcripción génica.

PPARα se distribuye mayoritariamente en tejidos con alta tasa metabólica como el tejido adiposo y el hígado, y en menor nivel en el corazón, los riñones, la placenta, el estómago y el músculo. Sus genes blanco participan de prácticamente todos los procesos del catabolismo lipídico incluyendo el transporte de ácidos grasos a través de la membrana celular, la β-oxidación mitocondrial y peroxisomal y el tráfico de colesterol *(Rakhshandehroo y col. 2007, Pyper y col. 2010)*. PPARα regula positivamente la transcripción de la acil CoA oxidasa (ACO) y la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), enzimas claves en la β-oxidación de ácidos grasos peroxisomal y mitocondrial, respectivamente *(Tugwood y col. 1992, Pyper y col. 2010)*. Se ha visto que agonistas de PPARα mejoran la sensibilidad a la insulina y disminuyen los niveles de lípidos en ratas Zucker y ratones alimentados con dietas con exceso de grasas *(Guerre-Millo y col. 2000, Ye y col. 2001)*. Además, PPARα regula positivamente a la LPL favoreciendo la incorporación de ácidos grasos contenidos en lipoproteínas *(Panadero y col. 2006, Zhao y col. 2015)*, disminuye la producción de VLDL e induce la producción de HDL-colesterol dando como resultado la eliminación del exceso de colesterol dentro del hígado *(Lefebvre y col. 2006)*. Por otro lado, PPARα regula la expresión de proteínas desacoplantes de la cadena respiratoria, incrementando así el gasto energético a través de la termogénesis *(Srivastava y col. 2006)*. Finalmente, se ha observado que la activación de PPARα modula negativamente la expresión de citoquinas pro-inflamatorios como IL-1 y TNF-α. Estas acciones, junto con su capacidad de disminuir la concentración lipídica en circulación y en los tejidos (vía activación de la lipólisis) le confiere a este receptor propiedades anti-inflamatorias y protectoras de la lipotoxicidad *(Pyper y col. 2010, Varga y col. 2011)*.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son capaces de activar a los tres isotipos de PPAR. Varios trabajos han estudiado el efecto de la administración dietaria de PUFA sobre la modulación de PPARα *(Varga y col. 2011, Grygiel-Gorniak 2014)*. Trabajos de nuestro laboratorio y de otros autores muestran que la administración de ligandos naturales de PPARα mediante dietas ricas en aceite de cártamo y aceite de oliva o mediante administración intra-fetal, inducen la activación de PPARα, modulando el metabolismo de lípidos placentario y en el hígado fetal en ratas sanas y diabéticas *(Hsu y Huang 2006, Capobianco y col. 2008, Martinez y col. 2011, Martinez y col. 2011)*.

Si bien hace muchos años se conoce que la regulación del balance energético se encuentra influenciada por las hormonas esteroideas sexuales gonadales, aún se sigue estudiando el papel que juegan en esta regulación *(Mystkowski y Schwartz 2000, Kautzky-Willer y Handisurya 2009)*. Las hormonas esteroideas sexuales femeninas participan en la regulación de la ingesta de alimentos, el peso corporal y el metabolismo de los lípidos *(Tchernof y col. 1998, Geary y Asarian 2001, D'Eon y col. 2005)*. De forma interesante, se ha observado que muchas de las funciones de PPARα, especialmente aqullas asociadas al metabolismo lipvdico, se encuentran sujetas a una regulaciσn gınero-dependiente *(Rando y Wahli 2011)*. Se encuentra reportado que los efectos de PPARα sobre el metabolismo de lípidos estarían influenciados por el estrógeno *(Yoon 2009, Yoon 2010)*. Además, numerosos trabajos indican que los heterodímeros de PPAR y de los receptores de estrógenos (ER) (PPAR/ER) son capaces de unirse a elementos de respuesta a estrógenos (ERE), y que PPAR y ER comparten cofactores, lo que sugiere una interacción entre las funciones de estos receptores *(Nunez y col. 1997, Tcherepanova y col. 2000, Zhu y col. 2000)*.

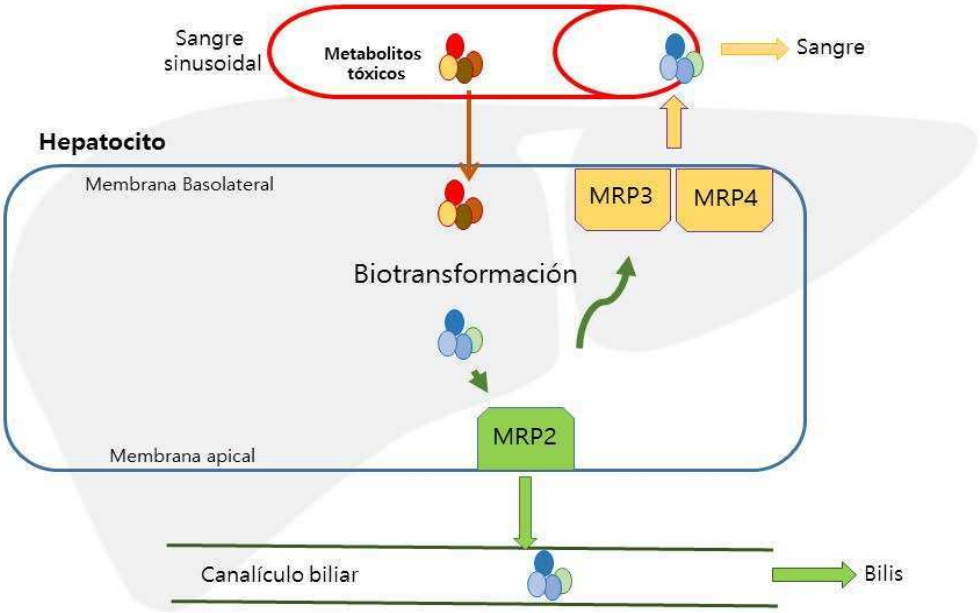
5.4. FUNCIÓN DE DETOXIFICACIÓN

El hígado es el principal órgano de detoxificación del organismo. En el proceso de detoxificación hepática intervienen numerosos transportadores encargados de incorporar los metabolitos tóxicos desde la sangre sinusoidal hacia dentro del hepatocito para su metabolización y posterior eliminación a través de la bilis o de la sangre (**Esquema 9**).

Los hepatocitos son células polarizadas. En la membrana basolateral, en contacto con la sangre sinusoidal, se encuentran transportadores que remueven xenobióticos y endobióticos desde la sangre portal y los transfieren hacia dentro del hepatocito. Entre ellos se encuentra el polipéptido cotransportador de taurocolato sódico, transportadores de aniones y cationes orgánicos y transportadores de nucleósidos *(Klaassen y Aleksunes 2010)*. Dentro del hepatocito los xenobióticos y endobióticos sufren reacciones de biotransformación. En una primera estapa son oxidados,

reducidos e/o hidrolizados por enzimas de fase I, y en una segunda etapa son conjugados con moléculas endógenas polares como sulfatos, ácido glucurónico, glutation, metilos y grupos acetilo por enzimas de fase II. Luego de estos procesos los metabolitos pueden ser excretados hacia la bilis a través de transportadores presentes en la membrana apical o del canalículo (en contacto con el canalículo biliar) como las proteínas de resistencia a multidroga, las bombas exportadoras de sales biliares, las proteínas asociadas al cáncer de mama, exportadores de nucleósidos, exportadores de colesterol, exportadores de multidrogas y toxinas y la proteína asociada a resistencia a multidrogas 2 (MRP2). Los metabolitos biotransformados también pueden ser excretados hacia la sangre a través de los transportadores presentes en la membrana basal, entre los cuales se encuentran los transportadores de colesterol y las proteínas asociadas a resistencia a multidrogas (MRP) 3, 4 y 6 (**Esquema 9**) *(Klaassen y Aleksunes 2010)*.

La regulación transcripcional de los transportadores y las enzimas de fase I y II es inducida por receptores nucleares como el receptor constitutivo de androstano (CAR), el receptor X de pregnano (PXR), PPARα y el factor de transcripción Nrf2 (factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar al 2) *(Shelby y Klaassen 2006, Klaassen y Aleksunes 2010)*.



Esquema 9: Participación de MRP2, 3 y 4 en la vía de detoxificación hepática. MRP: proteína asociada a resistencia a multidroga.

Proteínas asociadas a resistencia a multidrogas (MRPs)

Las MRPs son transportadores de la familia ABC (ATP Binding Cassette) involucrados en la excreción y detoxificación de xenobióticos y endobióticos orgánicos aniónicos. Su nombre proviene de su capacidad de eliminar diferentes drogas farmacológicas del organismo a través de la orina y las heces, determinando la biodisponibilidad de las mismas por parte del organismo, siendo así proteínas importantes a tener en cuenta en el desarrollo de fármacos *(Chandra y Brouwer 2004)*. Las MRPs también transportan metabolitos endógenos colaborando con la eliminación de desechos del metabolismo celular. MRP2 y MRP3 median el transporte de diferentes aniones orgánicos hacia el canalículo biliar y la sangre sinusoidal, respectivamente. Sus sustratos incluyen moléculas como por ejemplo sales biliares, leucotrienos, bilirrubina y estrógenos conjugados a glutation, ácido glucorónido y sulfato *(Konig y col. 1999, Klaassen y Aleksunes 2010)*. MRP4 transporta y regula la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc) *(Reid y col. 2003)*. Otros de sus sustratos son prostaglandinas, tromboxanos, ácido cólico, leucotrienos y sales biliares conjugados *(Zelcer y col. 2003, Klaassen y Aleksunes 2010)*. La regulación de los transportadores se encuentra sujeta a modificaciones a nivel epigenético, transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post- traduccional. A nivel post-transcripcional se encuentra regulado el reclutamiento de los transportadores en la membrana plasmática, la fosforilación/desfoforilación y las interacciones proteína-proteína. A nivel transcripcional los transportadores son regulados por receptores nucleares específicos, entre los que se encuentra Nrf2 y PPARα *(Klaassen y Slitt 2005, Amacher 2016)*.

El factor nucelar Nrf2

El factor de transcripción Nrf2 induce la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en procesos antioxidantes y de detoxificación, proveyendo así protección celular contra diversos estresores como las especies reactivas del oxígeno y especies electrofílicas *(Ma 2013, Valdecantos y col. 2015)*. El Nrf2 se encuentra asociado a su represor KEAP1 (KeapKelch-like ECH-associated protein 1), el cual inhibe la actividad de Nrf2 induciendo su degradación en los proteosomas. En condiciones de estrés oxidativo y electrofílico Nrf2 se disocia de KEAP y se trasloca hacia el núcleo, donde a través de la unión a secuencias ARE (elemento respondedor antioxidante) en el ADN de sus genes blanco regula la transcripción de genes involucrados en procesos antioxidantes y de detoxificación como aquéllos que codifican enzimas de fase II, superóxido dismutasa (SOD), glutatión (GSH), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión-S-transferasas (GST), y transportadores MRPs *(Okada y col. 2009, Klaassen y Reisman 2010, Ma 2013)*. Estudios recientes revelan que la activación farmacológica de Nrf2 regula también la transcripción de genes asociados con el metabolismo de lípidos, mostrando un efecto benéfico sobre la normalización de dislipemias asociadas a la patología diabética *(Shin y col. 2009, Bhakkiyalakshmi y col. 2016)*.

Es importante destacar el rol de la detoxificación hepática, que junto a los mecanismos anti-oxidantes celulares disminuyen los efectos pro-oxidantes y los metabolitos tóxicos resultantes de la oxidación de ácidos grasos, controlando el balance rédox celular.

6. LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y DEL NITRÓGENO

Especies reactivas del oxígeno

Los radicales libres son especies químicas capaces de existir en forma independiente que contienen electrones desapareados, por lo cual son sumamente reactivos y generan reacciones en cadena. El anión superóxido es un di-radical que requiere de cuatro electrones para su completa reducción a agua como producto final de la cadena de transporte de electrones. Las reacciones de donación de electrones al oxígeno generan especies reactivas del oxígeno (ROS) como productos intermedios, las cuales pueden ser radicalarias como el anión superóxido y el hidroxilo (compuestos altamente reactivos), y no radicalarias como el peróxido de hidrógeno *(Nordberg y Arner 2001) (Bindoli y col. 2008)*. Las ROS pueden ser generadas por una gran variedad de mecanismos en las células de organismos con metabolismo aerobio. Son producidas principalmente en las mitocondrias, como así también en peroxisomas, citosol y retículo endoplásmico. También pueden ser producidas en los tejidos por enzimas como la xantina oxidasa, NADPH oxidasa y citocromo P450. Se producen en el proceso de autooxidación de catecolaminas, en el metabolismo del ácido araquidónico y en la cadena respiratoria mitocondrial *(Xia y col. 1998, Griendling y col. 2000, Bindoli y col. 2008)*. En las células existen sistemas de defensa antioxidante encargados de metabolizar las ROS. Dentro de los antioxidantes enzimáticos encontramos la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, mientras que formando parte de los antioxidantes no enzimáticos podemos nombrar al glutatión, el ácido ascórbico, el ácido úrico, la vitamina E, la coenzima Q10 y los carotenos *(Nordberg y Arner 2001)*.

Entre los roles fisiológicos que poseen las ROS se encuentra la producción de anión superóxido por parte de las células fagocíticas, necesario para la eliminación de microorganismos y xenobióticos. El peróxido de hidrógeno de origen mitocondrial actúa como regulador de las vías de muerte celular *(Bindoli y col. 2008)*. Además, se conoce que las ROS se encuentran involucradas en cascadas de señalización celular, regulación metabólica y respuestas adaptativas *(Turpaev 2002)*. Sin embargo, las acciones más ampliamente conocidas de las ROS son aquéllas vinculadas con un rol patológico durante el desarrollo del estrés oxidativo. El estrés oxidativo es una situación en la cual las concentraciones intracelulares de las ROS se encuentran incrementadas sobre los valores fisiológicos. Puede producirse por aumento en la velocidad de producción de las mismas, una disminución de los niveles de antioxidantes o una combinación de ambas *(Sies y Cadenas 1985,*

Halliwell 2007). En estas concentraciones, las ROS interactúan con lípidos (oxidándolos y peroxidándolos), proteínas y ADN, ocasionando alteraciones en estas macromoléculas y muerte celular. Las ROS producen alteraciones a nivel de la estructura proteica, incrementando la carboxilación de las proteínas y ocasionando pérdida de su funcionalidad *(Stadtman y Levine 2003)*. A nivel del ADN, las ROS inducen ruptura de sus hebras, oxidación de purinas o entrecruzamiento entre proteínas nucleares y ADN *(Suematsu y col. 2003)*. Se ha observado un efecto de la peroxidación lipídica sobre la función de los lípidos celulares, acción que cuando se encuentra exacerbada ocasiona daño a nivel de las membranas biológicas, como así también de las organelas, alterando la fluidez y estructura de las mismas *(Radi y col. 1991, Rathore y col. 1998)*. Dadas estas acciones deletéreas, las ROS se encuentran implicadas en el desarrollo de patologías como cáncer, diabetes mellitus, aterosclerosis, isquemia, enfermedades neurodegenerativas y obesidad entre otras *(Spiteller 2006, Adibhatla y Hatcher 2008, Roberts y Sindhu 2009)*.

El óxido nítrico (ON)

El ON es un agente vasoactivo producido por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). La reacción enzimática utiliza arginina, oxígeno molecular y NADPH y da lugar a la formación de citrulina, NADPH y ON. El ON tiene una vida media corta y es rápidamente metabolizado por oxidación a nitratos y nitritos. Existen tres isoformas de la enzima NOS, codificadas por diferentes genes, con diferentes localización, regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad a inhibidores *(Forstermann y col. 1994)*. La *NOS endotelial* o eNOS se expresa en células endoteliales, células del músculo liso y células cardíacas, entre otras *(Palmer y col. 1988, Balligand y col. 1995) (Bredt y col. 1992)*. Su actividad es regulada por Ca^{2+} y calmodulina *(Forstermann y col. 1991)*. La *NOS neuronal* o nNOS es la fuente predominante de ON en las neuronas *(Jiang y col. 2004)*. Su expresión es constitutiva y su actividad, al igual que la eNOS, es regulada por Ca^{2+} y calmodulina *(Bredt y col. 1992)*. A diferencia de la eNOS y la nNOS, la *NOS inducible* o iNOS es independiente de la concentración de Ca^{2+} *(Pautz y col. 2010)*. Su expresión puede ser inducida mediante citoquinas y otros compuestos como CREB (proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc), NF-kB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), p53, STAT (transductor de señal y activador de la transcripción), entre otros *(Pautz y col. 2010)*. Es por ello que su expresión se incrementa en procesos patológicos, inflamatorios e infecciosos en diversos tipos celulares como macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, células endoteliales y músculo liso vascular entre otros *(Moncada y col. 1991)*.

El ON ejerce sus funciones principalmente uniéndose a enzimas que contienen hierro. La acción del ON en el sitio activo de la guanilato ciclasa activa la enzima y es reponsable de los

clásicos efectos mediados por el GMP cíclico y la proteína kinasa G como la vasodilatación *(Denninger y Marletta 1999)*. Entre las funciones fisiológicas del ON se encuentra la relajación del tono vascular *(Moncada y col. 1988)* y la activación plaquetaria *(Forstermann y col. 1994)*. De esta forma, a nivel endotelial, el ON producido por la eNOS ejerce funciones vasodilatadoras y antitrombóticas. Otra de las hemoproteínas que es regulada por el ON es la citocromo C oxidasa. La interacción del ON con esta enzima mitocondrial es competitiva con el O_2, siendo de esta forma el ON un inhibidor reversible de la cadena respiratoria mitocondrial, pudiendo alterar el gradiente de O_2 en los tejidos, participando así en la generación de ROS en procesos patológicos *(Shiva y col. 2001)*. Además de regular hemoproteínas, el ON y sus derivados transducen señales a través de la oxidación de lípidos y modificaciones post-traduccionales de proteínas como la nitración, nitrosilación y oxidación de sus cadenas laterales.

El ON puede tener tanto propiedades citotóxicas como citoprotectoras dependiendo de su concentración. Una excesiva producción de ON se encuentra asociada a muerte celular, neurotoxicidad e inflamación *(Sidorkina y col. 2003)(Hussain y col. 2003)(Gross y Wolin 1995) (Dawson y col. 1991)*. Además, el ON puede combinarse con el anión superóxido y formar peroxinitritos *(Beckman y Koppenol 1996)*. En condiciones de estrés oxidativo, caracterizado por un aumento de las ROS, por ejemplo en procesos inflamatorios, se favorece la formación de peroxinitritos *(Gero y Szabo 2006, Szabo y Modis 2010, Soriano y col. 2011)*. Entre sus múltiples acciones, estas moléculas inducen peroxidación lipídica, inhiben el transporte mitocondrial de electrones, generan ruptura de la estructura del ADN y nitran proteínas en residuos de tirosina y cisteína alterando la estructura y función de las moléculas modificadas e interfiriendo con las vías de señalización celular de las cuales ellas participan *(Radi y col. 1991, Szabo 2003, Myatt 2010)*.

Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la placenta

El ON se encuentra involucrado en múltiples funciones reproductivas como la implantación, el proceso de decidualización y la división celular del embrión temprano *(Norwitz y col. 2001, Thaler y Epel 2003)*. La formación de la placenta y el rápido crecimiento del sinciciotrofoblasto en la gestación temprana se asocian con un mayor requerimiento de flujo sanguíneo en el endometrio. En la gestación se ha evidenciado un incremento de nitratos (productos del metabolismo del ON) y de nitrosilhemoglobina en circulación, sugiriendo que existe un incremento en la biosíntesis de ON durante la gestación necesario para cubrir las mayores demandas tisulares *(Conrad y col. 1993)*. El ON es el principal regulador del flujo placentario, actúa como un potente vasodilatador en la circulación feto-placentaria *(Myatt y col. 1991)*, y tiene las funciones de mantener el tono vascular basal y atenuar la acción de agentes vasoconstrictores tales como los tromboxanos y la endotelina-1,

lo cual le confiere un rol clave en la modulación del flujo sanguíneo y el intercambio de moléculas entre la madre y el feto *(Myatt 2010)*.

El ON también interviene en el proceso de diferenciación e invasividad de los trofoblastos y en la angiogénesis durante el desarrollo placentario *(Novaro y col. 1997, Ahmed y Perkins 2000)*. Durante la organogénesis temprana el ON actúa como morfógeno conduciendo a la diferenciación celular o a la apoptosis, por lo que su localización y concentración deben estar finamente reguladas para una normal organogénesis *(Lee y Juchau 1994, Jawerbaum y Gonzalez 2005)*.

Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en el hígado

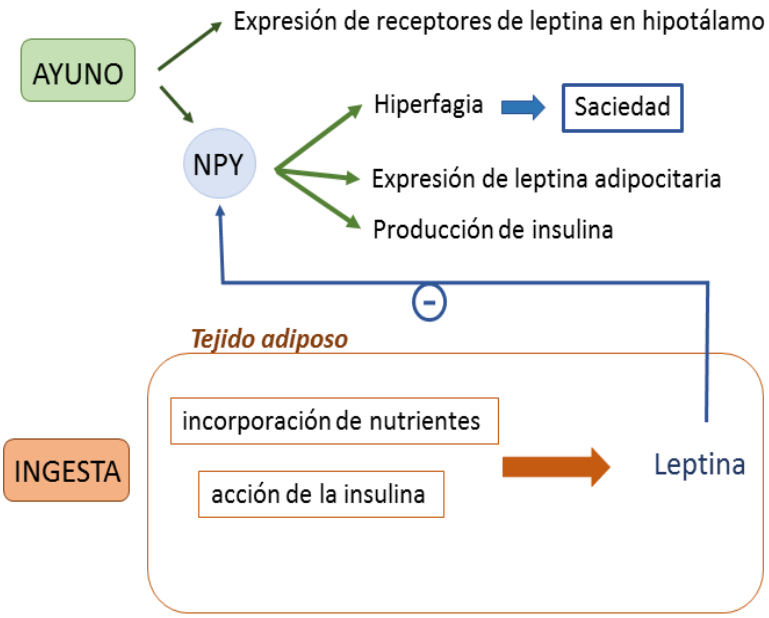
El hígado es un órgano con alta actividad metabólica, sus procesos fisiológicos como la oxidación de ácidos grasos y la respiración aeróbica se encuentran acoplados a la producción ROS *(Jaeschke y Ramachandran 2011)*. Como se mencionó anteriormente, el hígado posee sistemas de detoxificación y mecanismos anti-oxidantes que disminuyen los efectos pro-oxidantes y los metabolitos tóxicos resultantes de la oxidación de ácidos grasos, controlando el balance rédox celular. Sin embrago, en condiciones de elevada actividad lipolítica, por ejemplo frente a un exceso de glucosa y/o lípidos en circulación, aumenta la producción de ROS y se desencadenan procesos inflamatorios. Además, si el hígado no es capaz de metabolizar el exceso de nutrientes se produce una sobreacumulación hepática de lípidos, la cual se asocia a inflamación y estrés oxidativo *(Hensley y col. 2000, Fernandez-Sanchez y col. 2011)*.

7. LA LEPTINA

7.1. CARACTERÍSTICAS

La leptina es un polipéptido no glicosilado de 146 aminoácidos (16 kDa). Producto del gen ob, codificado en la rata en el cromosoma 4 (q22) y en humanos en el cromosoma 7 (q31.3), la leptina fue descubierta y clonada en 1994, y presenta características similares en estas dos especies *(Zhang y col. 1994)*. En 1950 se había identificado una cepa de ratones obesos recesivos para el gen ob (ob/ob) y una cepa de ratones recesivos para el el gen db (db/db) que presentaban hiperfagia, una tasa metabólica disminuida (que resultaba en obesidad mórbida) y predisposición a desarrollar diabetes y alteraciones endocrinas *(Coleman 1978, Friedman y Halaas 1998)*. Experimentos de parabiosis en los que se unió el sistema circulatorio de la cepa ob/ob con el de la cepa db/db o la cepa normal, mostraron que los ratones ob/ob carecían de un factor soluble, presente en las cepas db/db y normal, que anulaba la hiperfagia y disminuía los depósitos de grasa en ratones ob/ob. Sin embargo, ni la cepa ob/ob ni la normal pudieron normalizar el fenotipo de la cepa db/db, sugiriendo que los ratones db/db eran insensibles al factor soluble que normalizaba el fenotipo de los ratones ob/ob. Luego se caracterizó a la cepa db/db como portadora de la mutación recesiva para el receptor del gen ob *(Coleman y Hummel 1969, Fruhbeck y Gomez-Ambrosi 2001)*. Experimentos posteriores mostraron que la leptina es el factor soluble del cual carecen los ratones ob/ob y que la administración de la proteína a esta cepa disminuye la ingesta, el peso y el porcentaje de grasa, aumenta la tasa metabólica y restaura los valores de glucemia e insulinemia, normalizando así los parámetros metabólicos alterados *(Pelleymounter y col. 1995)*.

La leptina atraviesa la barrera hematoencefálica mediante un sistema saturable, se une a receptores en el hipotálamo e inhibe la síntesis del neuropéptido Y *(Banks y col. 1996, Erickson y col. 1996)*. Este neurotransmisor se encuentra involucrado en la regulación del apetito, la administración intracerebroventricuar del mismo produce hiperfagia, hiperinsulinemia independiente de la hiperfagia y un aumento de la expresión de leptina en el tejido adiposo mediante estimulación de vías aferentes *(McLaughlin y col. 1991, Sainsbury y col. 1996)*. El ayuno induce la producción de NPY y la expresión del receptor de leptina en el hipotálamo. Además, la síntesis del NPY induce la expresión de leptina adipocitaria. Luego de la ingesta, la incorporación de lípidos en el tejido adiposo y la acción de la insulina inducen la síntesis y producción de leptina que cierra el circuito en el hipotálamo inhibiendo al NPY e induciendo saciedad *(Sivitz y col. 1998, McAlister y Van Vugt 2004)* (**Esquema 10**).



Esquema 10: Regulación del apetito en los períodos de ingesta y de ayuno.

Inicialmente se observó que la leptina era producida y secretada a la sangre por los adipocitos, y que sus niveles en circulación eran proporcionales a la masa grasa corporal, reflejando así el estado de las reservas energéticas del organismo *(Maffei y col. 1995)*. Sin embargo, hoy en día se conoce que existen numerosas fuentes productoras de leptina como la placenta, el hígado, la mucosa gástrica, la médula ósea, el músculo esquelético y el hipotálamo *(Hauguel-de Mouzon y col. 2006)*. Algunos trabajos han reportado que la leptina es también producida en diversos tejidos fetales incluyendo el tejido adiposo subcutáneo *(Hoggard y col. 1997, Lepercq y col. 2001, Muhlhausler y col. 2007)*.

La producción de leptina y la presencia de sus receptores en diversos tejidos del organismo como el hígado, el riñón, el páncreas, el hipotálamo, el útero, el ovario, las células sanguíneas, el intestino, el tejido adiposo, el músculo esquelético y la placenta revela la acción pleiotrópica de la hormona y su participación en la regulación de numerosos procesos como la reproducción (interviniendo en la función ovárica, la maduración del ovocito, la implantación y fertilidad y el desarrollo del embrión), el metabolismo de lípidos y glucosa, la angiogénesis, la termogénesis, el control de la presión sanguínea y la formación de hueso entre otros *(Margetic y col. 2002)*. Múltiples trabajos han demostrado que las acciones de la leptina son específicas para cada tejido *(Muoio y Lynis Dohm 2002)*. La hormona regula la homeostasis energética del organismo a través del sistema nervioso central modulando el apetito y también posee numerosos efectos en la periferia

que conducen a la disminución de las reservas energéticas mediante la estimulación del metabolismo *(Friedman y Halaas 1998)*.

7.2. RECEPTORES Y SEÑALIZACIÓN

- Receptores

El receptor de leptina (ObR) es producto del gen db, llamado de esta forma debido a que inicialmente se observó que ratones nulos para dicho gen (db/db) presentaban una predisposición a desarrollar diabetes y obesidad *(Coleman 1978)*. El modelo análogo en ratas es el Zucker-Zucker (fa/fa), ratas que poseen receptores de leptina no funcionales y desarrollan obesidad y varias de las características observadas en el síndrome metabólico humano *(Aleixandre y Miguel 2008)*.

ObR presenta similitudes con los receptores de la familia de citoquinas de clase 1. Se conocen seis isoformas de ObR generadas como producto de splicing alternativo o a través de procesos proteolíticos *(Tartaglia 1997)*. Las isoformas se clasifican en larga (ObRb), cortas (ObRa, ObRc, ObRd y ObRf) y soluble (ObRe).

La *isoforma larga (ObRb)* posee un dominio intracelular de 300 residuos. Dentro del dominio citoplasmático posee dos regiones conservadas llamadas box 1 (aminoácidos 6 a 17) y box 2 (aminoácidos 49 a 60), necesarias para la transducción de la señal completa, la cual involucra el reclutamiento de JAK2 (tirosinas kinasas de la familia Janus 2) a la región box1 y de STAT 3 y 5 a la región box 2. A través de esta isoforma la leptina induce todos sus efectos conocidos a nivel del sistema nervioso central y en la periferia *(Fruhbeck 2006)*.

La isoforma larga y las *isoformas cortas* poseen idéntico dominio extracelular y dominio transmembrana y comparten los primeros 29 aminoácidos del dominio intracelular. Las isoformas cortas (ObRa, ObRc, ObRd, ObRf) se diferencian entre sí por poseer pequeñas variaciones en la longitud del dominio intracelular. La isoforma ObRa es la más abundante y se encuentra ampliamente distribuída en los tejidos del organismo *(Park y Ahima 2014)*. Si bien en un primer momento no se les atribuía un rol a las isoformas cortas del receptor en la inducción de las acciones de leptina, en la actualidad se les atribuye la mayoría de las acciones periféricas de leptina, ya que estas isoformas poseen la región box 1 necesaria para reclutar y activar a JAK2 *(Bjorbaek y col. 1997, Murakami y col. 1997, Challier y col. 2003, Fruhbeck 2006)*. Sin embargo, se ha observado que las consecuencias fenotípicas generadas debido a la ausencia de las isoformas cortas del receptor de leptina son modestas en comparación a las ocasionadas frente a la falta de ObRb, lo que sugiere una menor potencia de señalización por parte de las isoformas cortas *(Bjorbaek y col. 1997,*

Li y col. 2013). Algunos trabajos atribuyen a ObRa el rol de transportar a la leptina en el fluido cerebroespinal y a través de la barrera hematoencefálica, mientras que otros autores sugieren un rol de ObRa en la regulación de la biodisponiblidad de leptina *(Hileman y col. 2002, Smith y Waddell 2003, Li y col. 2013).*

La *isoforma soluble* se genera a partir de splicing alternativo o por clivaje proteolítico de isoformas presentes en las membranas celulares *(Ge y col. 2002).* Esta isoforma contiene solamente el dominio extracelular de unión a leptina y se postula que regula la concentración de la leptina libre en circulación al unirse a la hormona y aumentar su vida media y disminuir su biodisponibilidad *(Sinha y col. 1996, Tu y col. 2008).*

- Señalización

La unión de la leptina a su receptor induce su dimerización y el reclutamiento de la quinasa JAK2, que se autofosforila y fosforila a múltiples residuos del dominio citoplasmático del receptor: Tirosina 985, 1077 y 1138 (**Esquema 11**). La fosforilación en tirosina 1138 recluta y activa STAT1/3 (transductor de señal y activador de la transcripción), y la fosforilación en tirosina 1077 a STAT5. Tras su activación STAT3/5 trastocan al núcleo, donde modulan la transcripción de sus genes blanco.

La fosforilación en Tyr985 debido a JAK2 conduce a la fosforilación de IRS 1/2 y consecuente activación de la vía PI3K (fosfatidilinositol 3 kinasa). La fosforilación de PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) por PI3K conlleva a la formación de PIP3 (fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato), un potente activador de la kinasa PDK1 (proteína quinasa dependiente de fofatidilinositol 1) que posee numerosas funciones, entre las cuales se encuentra la regulación de Akt. Akt activado fosforila y activa a eNOS, enzima reguladora de la producción de óxido nítrico; a mTOR, regulador del crecimiento y proliferación celular en función del censado de nutrientes celulares; y a fosfodiesterasas (PDE), que a través de la disminución de las concentraciones a AMPc inhiben al neuropéptido Y en el hipotálamo, regulando el apetito y el balance energético a nivel central. La señalización vía PI3K también regula a las proteínas Rho y GTPasas encargadas de la regulación de la apoptosis y remodelación del citoesqueleto. La vía PI3K es compartida con la insulina, que a través de la unión a su receptor recluta y activa a IRS1/2 *(Donato y col. 2010).*

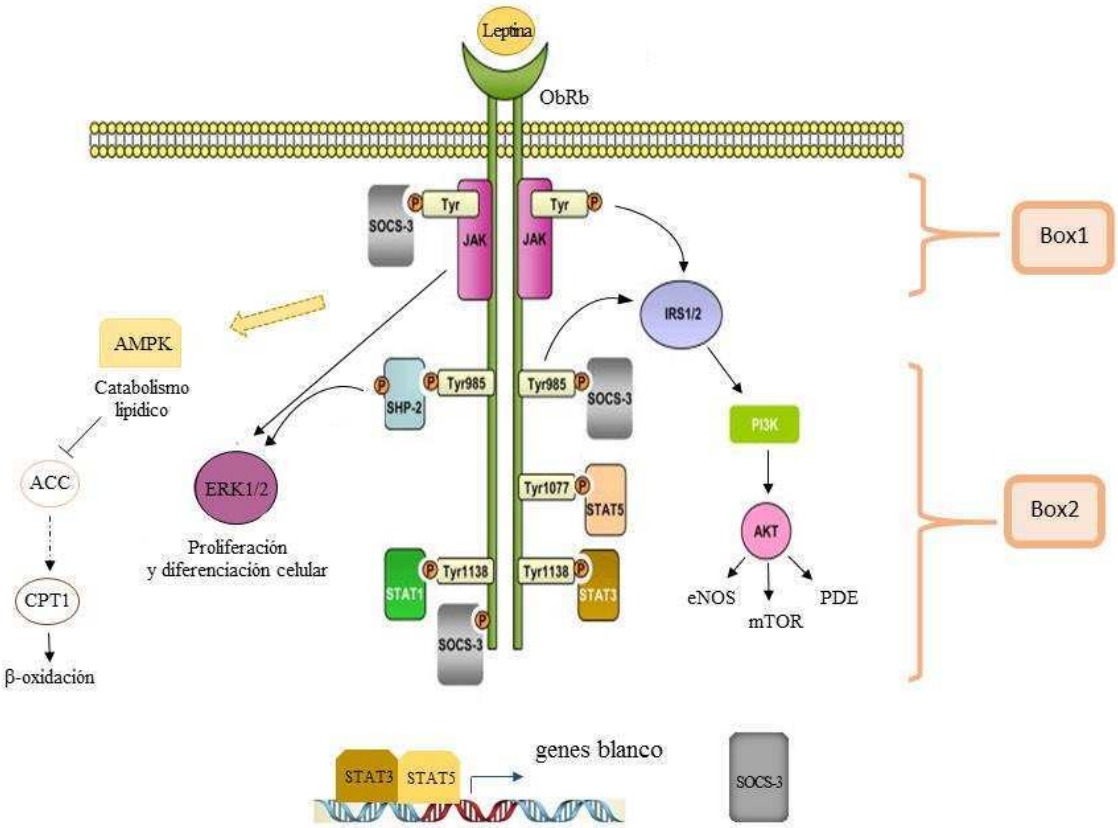
La fosforilación en Tyr985 debido a JAK2 crea un sitio de unión para proteínas que contienen un dominio SH2, como las proteínas tirosinas fosfatasa con dominio SH2 (SHP-2). El reclutamiento de estas moléculas es el primer paso en la activación de ERK1/2, componente de la

cascada de señalización de las MAPK (proteínas kinasas activadas por mitógenos), involucrada en la proliferación y diferenciación celular.

Cabe mencionar que el reclutamiento y fosforilación de JAK2 puede también activar las vías PI3K y MAPK independientemente de la fosforilación en Tyr985 del receptor *(Fruhbeck 2006)*.

En la actualidad se encuentra bien establecido que la leptina induce la oxidación de ácidos grasos generando un efecto protector contra la lipotoxicidad en tejidos no adiposos, acción mediada en parte por la activación de la AMPK (proteínas kinasas activadas por AMP) *(Minokoshi y col. 2002, Unger 2004, Ceddia 2005)*.

La señalización de la leptina está regulada negativamente por proteínas intracelulares, entre las que se encuentra SOCS3 (supresor de la señalización de citoquinas 3) y PTP1B (proteína fosfatasa de tirosina 1B). La transcripción de SOCS3 es inducida por STAT3. SOCS3 se une a JAK2 y a la Tyr985 fosforilada (probablemente compitiendo con las SHP2 por el sitio de unión), lo cual resulta en la inhibición de la señalización vía ObR previniendo la sobre activación del receptor *(Bjorbaek y col. 1999, Bjorbak y col. 2000)*. La fosfatasa PTP1B desfosforila e inhibe a JAK2, regulando también la señalización de la leptina *(Zabolotny y col. 2002)*.



Esquema 11: Vías activadas por leptina.

7.3. FUNCIONES

Leptina y control del apetito

En el cerebro ee observa una elevada expresión de ObRb, principalmente en el hipotálamo. La leptina estimula las neuronas anorexigénicas POMC y CART (neuronas que coexpresan proopiomelanocortina y el transcripto regulado por cocaína y metanfetamina), a la vez que inhiben la liberación de neuropéptidos orexigénicos NPY y AgRP (péptido relacionado con agouti), dando lugar a la reducción de la ingesta *(Myers y Simerly 2010)*. Junto a este efecto, la leptina modula el metabolismo de los órganos periféricos mediante una señal eferente transmitida a través del SNC y el sistema nervioso autónomo. De esta forma, la leptina impacta en el sistema nervioso central estimulando el gasto energético en los tejidos periféricos reduciendo el excedente de lípidos almacenados *(Bartness y col. 2010, Belgardt y Bruning 2010)*.

Leptina y metabolismo de lípidos

La leptina induce el catabolismo de lípidos en el músculo, el hígado y el tejido adiposo *(Wang y col. 1999, Ceddia 2005, Wein y col. 2007)*. Activa a AMPK, enzima que funciona como un "sensor de energía metabólica celular" regulando la ingesta de alimentos y el metabolismo de lípidos en respuesta a señales hormonales y de nutrientes en el hipotálamo *(Minokoshi y col. 2004)*. Frente a una disminución en la relación ATP/AMP, la enzima AMPK activa el catabolismo con el fin de producir ATP, mientras que inhibe procesos celulares que implican gasto de energía. Fosforila e inhibe la actividad de ACC (acetil-CoA carboxilasa), lo que resulta en una disminución de los niveles de malonil- CoA y en la consecuente desinhibición de CPT1, estimulando la β-oxidación mitocondrial de ácidos grasos *(Winder y Hardie 1999, Hardie y Pan 2002)*. La leptina es capaz de activar a AMPK tanto mediante efectos hipotalámicos como de manera directa en el tejido blanco a través del aumento de los niveles intracelulares de AMP *(Fruhbeck 2006)(Ceddia 2005)(Minokoshi y col. 2002)*. En el hígado, la AMPK induce la oxidación de ácidos grasos e inhibe la síntesis de ácidos grasos, colesterol y la gluconeogénesis *(Browning y Horton 2004, Towler y Hardie 2007)*.

Además, la leptina induce la transcripción de dos genes involucrados en el catabolismo de lípidos: CPT1 y ACO, genes codificantes para enzimas clave en la β-oxidación mitocondrial y peroxisomal, respectivamente. Esta regulación requiere la presencia y activación de PPARα *(Lee y col. 2002)*, regulador de numerosos genes del catabolismo de lípidos entre los cuales se encuentran ACO y CPT1 *(Tugwood y col. 1992, Gulick y col. 1994)*. Se ha reportado que ratones nulos para PPARα se muestran resistentes a los efectos catabólicos de la leptina *(Lee y col. 2002)*.

Leptina e Insulina

La relación entre los efectos de la leptina y la insulina es compleja. Si bien existen caminos de señalización en común entre estas hormonas, se ha observado un efecto inhibitorio de leptina sobre algunas vías de señalización de la insulina *(Kellerer y col. 2001).* Se encuentra reportado que la leptina inhibe la síntesis y secreción de insulina basal y estimulada tanto en células beta aisladas como en diversas líneas celulares, islotes pancreáticos y perfundidos de páncreas. Estos efectos inhibitorios de leptina tanto sobre la acción como la expresión de insulina se postulan como un mecanismo de retroalimención negativa que acota los efectos anabólicos de la insulina *(Niswender y Magnuson 2007).*

En el tejido adiposo la leptina posee una acción opuesta a la de la insulina ya que inhibe el transporte de glucosa estimulado por insulina y la lipogénesis, mientras que promueve la utilización de los ácidos grasos. En el músculo, la leptina también favorece la utilización de lípidos, sin embargo aumenta el transporte de glucosa y estimula la síntesis de glucógeno, presentando un efecto hipoglucemiante similar al de insulina *(Muoio y Lynis Dohm 2002)*(Ceddia y col 1998).

En cuanto a la regulación de insulina sobre leptina, se sabe que insulina regula positivamente la síntesis y secreción de leptina adipocitaria y placentaria *(Tsai y col. 2012, Perez-Perez y col. 2013).*

Leptina y angiogénesis

La leptina induce angiogénesis en parte a través de sus efectos proliferativos en células endoteliales. Se ha observado que la hormona estimula la proliferación de células endoteliales y la neovascularización tanto *in vitro* como *in vivo (Sierra-Honigmann y col. 1998, Park y col. 2001, Jin y col. 2003, Liapakis y col. 2008).* También se ha observado el efecto de la leptina de estimular la formación de tubos en células endoteliales HUVEC cultivadas sobre fibrina y en cultivos de trofoblastos de primer trimestre, evidenciando el efecto de la hormona sobre la estimulación de la proliferación y migración de células endoteliales y trofoblásticas *(Bouloumie y col. 1998, Basak y Duttaroy 2012).* Los efectos angiogénicos de la leptina se han detectado tanto en presencia del principal regulador de la angiogénesis, el factor de crecimiento endotelial vascular VEGF2, como de manera independiente de este factor *(Kitade y col. 2006, Basak y Duttaroy 2012).* La presencia de las isoformas largas y cortas del receptor de leptina en células endoteliales, sumado a la capacidad de la leptina de inducir angiogénesis a través de la vía PI3K/Akt sugieren que las dos isoformas del receptor se encontrarían involucradas en los efectos angiogénicos de leptina *(Garonna y col. 2011, Ozmen y col. 2015).*

Leptina y óxido nítrico

El principal mediador de las acciones de leptina sobre el tono vascular es el óxido nítrico (ON). La administración aguda de leptina en ratas conduce a un aumento del ON en circulación de manera dosis dependiente *(Beltowski y col. 2002, White y col. 2006)*. En el humano, los niveles de leptina correlacionan positivamente con los niveles de ON, sugiriendo que la leptina ejercería a través de la estimulación de la produccion de óxido nítrico una regulación sobre la presión sanguínea y el tono vascular *(Tsuda y Nishio 2004)*. Sin embargo, el efecto de la leptina sobre el tono vascular es controversial. Se postula que en situaciones fisiológicas la leptina mantiene un balance adecuado entre sus efectos vasoconstrictores mediados por la activación simpática a nivel del SNC y sus efectos vasodilatadores mediados por la producción de ON *(Kimura y col. 2000, Benkhoff y col. 2012)*, mientras que en condiciones de hiperleptinemia crónica como la obesidad, el efecto vasodilatador de la leptina se encuentra alterado y se produce disfunción endotelial y un aumento de la presión arterial, atribuyéndose a leptina un rol en la producción de la hipertensión asociada a la obesidad *(Toda y Okamura 2013)*.

Leptina e inflamación

La leptina activa respuestas inflamatorias. El receptor de leptina se encuentra en neutrófilos, monocitos, macrófagos, subpoblaciones de células T y B, mastocitos, células dendríticas y natural killers *(La Cava y Matarese 2004)*. La leptina se une a sus receptores en macrófagos y monocitos produciendo un aumento de la fagocitosis, previniendo la apoptosis, induciendo la síntesis de ON y estimulando la producción de citoquinas proinflamatorias (como IL1, IL6 y TNFα) y de quimioatractantes *(Batra y col. 2010)*. Las citoquinas inflamatorias aumentan la expresión del ARN mensajero de leptina conduciendo a un aumento de la producción de esta hormona y estableciendo así un proceso de inflamación crónica, el cual se asocia al desarrollo de resistencia a leptinay a un aumento de la expresión de SOCS3. La inducción de la respuesta inflamatoria vía leptina se produce de forma paralela a un aumento de la producción de ROS y ON por parte de células del sistema inmune como macrófagos y neutrófilos *(Moncada y col. 1991, Shoelson y col. 2006, Paz-Filho y col. 2012)*.

En períodos de adecuada nutrición la leptina señaliza y transmite al cerebro que el cuerpo posee energía suficiente para las diversas funciones biológicas, entre las que se encuentra la respuesta inmune. En períodos de inadecuada nutrición, los niveles circulantes de leptina son bajos o sus efectos biológicos se encuentran alterados, afectando el funcionamiento de las células del sistema inmune involucradas en la respuesta innata y adaptativa *(Bernotiene y col. 2006)*.

7.4. REGULACIÓN DE LA LEPTINA

La secreción de leptina se encuentra regida por mecanismos constitutivos, sin embargo los niveles de la hormona se encuentran regulados por los diferentes estados fisiológicos que atraviesa el organismo. Los niveles de leptina aumentan con el aumento de la adiposidad tanto en roedores *(Frederich y col. 1995)* como en humanos *(Considine y col. 1996)*, por lo cual se propone que la leptina actúa como "señal adipostática" negativa a nivel del hipotálamo, regulando la homeostasis energética y limitando la sobreacumulación de reservas lipídicas en períodos de sobre-ingesta *(Campfield y col. 1995)*. Sin embrago, los niveles de leptina disminuyen durante el ayuno de manera no proporcional a una disminución del tejido adiposo *(Ahima y col. 1996)* y aumentan horas después de la ingesta en humanos y roedores *(Saladin y col. 1995, Kolaczynski y col. 1996)*. El efecto posprandial de leptina se encuentra mediado, al menos en parte, por la insulina, hormona que estimula la síntesis y producción de leptina en los adipocitos humanos y de roedores *(Barr y col. 1997, Havel 2000)* .

Otro nivel de regulación de la acción de la leptina implica la modulación de su biodiponibilidad y bioactividad en los tejidos blancos. El receptor soluble de leptina participa de esta modulación, aumentando la vida media de la hormona e impidiendo la unión de leptina a sus receptores funcionales *(Sagawa y col. 2002, Perez-Perez y col. 2015)* .

Los niveles de leptina aumentan durante la gestación tanto en humanos como en roedores *(Hardie y col. 1997, Amico y col. 1998)*. En humanos, los altos niveles de insulina en circulación durante la gestación inducen la producción placentaria y adipocitaria de leptina *(Barr y col. 1997, Perez-Perez y col. 2013)*. En forma importate, en trofoblastos humanos la diferenciación de citotrofoblastos a sinciciotroboblastos es concomitante con un aumento en la producción de leptina *(Guibourdenche y col. 2000)*. La expresión placentaria de leptina es estimulada por la gonadotrofina coriónica, el 17-β-estradiol, y el AMPc a través de las vía de señalización MAPK y PI3K *(Maymo y col. 2011)*. Así, el aumento de estradiol y de la gonadotrofina coriónica durante la gestación podría explicar el aumento de la producción de leptina placentaria y el concomitante aumento de la leptinemia materna en esta etapa. En la rata, la producción de leptina está relacionada con la producción hormonal placentaria, y su síntesis y liberación se encuentra a su vez modulada por hormonas. Se ha reportado que en el laberinto murino la leptina co-localiza con las hormonas lactógeno placentario I y II *(Hoggard y col. 1997, Kawai y col. 1999)*.

Los niveles de leptina en circulación muestran dimorfismo sexual entre especies. En humanos, los niveles de leptina son mayores en hembra respecto de macho, debido a una mayor producción de leptina en el tejido adiposo subcutáneo, a una mayor estimulación de expresión de

leptina por los estrógenos en la hembra y a la inhibición de la expresión de leptina por testosterona en el macho *(Rosenbaum y col. 1996, Casabiell y col. 1998, Roemmich y col. 1998)*. En la rata, la mayoría de los autores no observan diferencias género-dependientes en los niveles de leptina *(Coatmellec-Taglioni y col. 2003, Palou y col. 2010)*.

7.5. LEPTINA Y GESTACIÓN

Los niveles circulantes de leptina materna aumentan durante la gestación, manteniéndose constantes durante el primer y segundo trimestre, mostrando un pico a finales del segundo o principios del tercero y disminuyendo drásticamente luego del parto *(Hauguel-de Mouzon y col. 2006)*. En la rata este aumento es de dos a tres veces mayor respecto a los valores presentes fuera de la preñez *(Chien y col. 1997, Amico y col. 1998)*. Los incrementados niveles de leptina materna durante la gestación provienen de la producción adipocitaria materna (cuya masa aumenta durante la gestación) *(Frederich y col. 1995, Considine y col. 1996, Havel 2000)* y de un gran aporte por parte de la producción placentaria, ampliamente estudiado en humanos, donde se conoce que aproxidamente un 98% de la leptina placentaria es secretada hacia la circulación materna y el 2% restante hacia circulación fetal *(Linnemann y col. 2000, Hoggard y col. 2001)*. En general, la mayoría de los autores consideran que los niveles de leptina en plasma fetal son independientes del aporte de leptina por parte de la circulación materna o la placenta y que dependen principalmente de la producción de leptina por parte del tejido adiposo fetal y otros tejidos fetales *(Lin y col. 2000, Buchbinder y col. 2001, Lepercq y col. 2001)*.

En roedores, la significancia de la contribución de leptina placentaria a los niveles de leptina en circulación fetal no se encuentra establecida. Si bien se observa producción placentaria de leptina, no está claro cuál es la contribución de esta hormona a la circulación materna o fetal *(Hoggard y col. 2000, Mazzucco y col. 2013)*. Algunos autores sugieren la existencia de un pasaje de leptina materna hacia el feto a través de la placenta *(Smith y Waddell 2003, Wu y col. 2015)*.

Los receptores de leptina se encuentran en la placenta de humanos y roedores, revelando un efecto parácrino/autócrino de la hormona *(Hoggard y col. 1997, Maymo y col. 2011)*. En un intento por dilucidar el rol de la leptina durante la gestación, numerosos trabajos han establecido correlaciones entre diversos parámetros de crecimiento fetal y placentario y las concentraciones de leptina en sangre de madre y neonatos humanos. Los trabajos muestran que los niveles de leptina en plasma materno guardan relación con los de cordón umbilical y estos a su vez correlacionan con el peso del neonato y con el peso de la placenta. Estas observaciones sugieren que la leptina tendría un rol promotor en el crecimiento fetal *(Ong y col. 1999, Jakimiuk y col. 2003, Manderson y col. 2003)*.

En concordancia con esto, se observa un aumento de los niveles circulantes de leptina en fetos macrosómicos y una disminución de esta hormona en circulación en fetos con restricción del crecimiento, tanto en humanos como en modelos experimentales *(Henson y Castracane 2006, Mazzucco y col. 2013).*

En la placenta, la leptina posee funciones anabólicas asociadas a la proliferación de trofoblastos, la incorporación de aminoácidos y la síntesis de proteínas *(Perez-Perez y col. 2009, Basak y Duttaroy 2012).* Estos efectos junto a las acciones angiogénicas y la capacidad de modular el tono vascular proporcionan más evidencia para atribuirle a la leptina un rol en la regulación del crecimiento fetal. Además, el hecho de que los receptores de leptina se encuentren en numerosos tejidos fetales sugiere que la hormona posee funciones durante el crecimiento y desarrollo fetal *(Henson y Castracane 2006).*

A pesar de los elevados niveles de leptina en circulación durante la gestación se observa una falta de inducción de saciedad por parte de la hormona en modelos murinos. Esto se debe a la resistencia a la leptina en el hipotálamo, evento que se vincula a una menor expresión o señalización de ObRb o a una disminución de la leptina libre debido al aumento de los niveles ObRe *(Garcia y col. 2000, Ladyman y col. 2012).* La falta de inducción de saciedad por parte de la leptina sumado al aumento de las acciones lipolíticas de la hormona en la periferia induce un aumento de la biodisponibilidad de lípidos, utilizados por el metabolismo materno y transferidos al feto en desarrollo para sustentar su crecimiento.

8. EL SOBREPESO Y LA OBESIDAD

8.1. EPIDEMIOLOGÍA

El sobrepeso y la obesidad han alcanzado proporciones epidémicas a nivel mundial, siendo uno de los problemas de salud pública más graves del siglo XXI. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS): "El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud". El índice de masa corporal (IMC) establece el estado energético de un individuo de acuerdo con su altura y peso como kg/m^2. Según la OMS, los individuos con un IMC igual o superior a 25 son considerados con sobrepeso y por encima de 30, obesos.

La obesidad es una enfermedad compleja multifactorial influenciada por el estilo de vida, factores conductuales, ambientales y genéticos. Una nutrición inadecuada, con alto contenido de grasas e hidratos de carbono, en conjunto con una vida sedentaria, favorecen el desarrollo de este desorden metabólico *(Riccardi y col. 2004, Esposito y col. 2014)*.

Los informes de la OMS revelan que (http://www.who.int/features/factfiles/obesity/es/):

- *Desde 1980, la incidencia de la obesidad se ha más que duplicado en todo el mundo.*
- *En 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 años o más tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos.*
- *La mayoría de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad se cobran más vidas que la insuficiencia ponderal.*
- *El 44% de los casos mundiales de diabetes, el 23% de las cardiopatías isquémicas y el 7-41% de determinados cánceres son atribuibles al sobrepeso y la obesidad.*
- *Cada año mueren, como mínimo, 2.800.000 personas a causa de la obesidad o el sobrepeso.*

  Los informes de la OMS también revelan cifras alarmantes respecto al sobrepeso y la obesidad infantil (http://www.who.int/end-childhood-obesity/facts/es/):
- *En 2013, más de 42 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso.*
- *En los países en desarrollo con economías emergentes (clasificados por el Banco Mundial como países de ingresos bajos y medianos) la prevalencia de sobrepeso y obesidad infantil entre los niños en edad preescolar supera el 30%.*
- *Si se mantienen las tendencias actuales, el número de lactantes y niños pequeños con sobrepeso aumentará a 70 millones para el año 2025.*

- *La obesidad infantil está asociada a una amplia gama de complicaciones de salud graves y a un creciente riesgo de contraer enfermedades prematuramente, entre ellas, diabetes y cardiopatías.*

En el marco de la preocupación por el crecimiento de la obesidad infantil la OMS creó en el 2014 la "Comisión para acabar con la obesidad infantil", encargada de presentar a los gobiernos recomendaciones cuya finalidad es revertir la creciente tendencia de los niños menores de cinco años al sobrepeso y la obesidad (http://www.who.int/end-childhood-obesity/es/) *(Ambrosini 2014)*.

8.2. CARACTERÍSTICAS

La obesidad se encuentra asociada a enfermedades crónicas como la diabetes tipo 2, enfermedades cardíacas, hipertensión, dislipemias y cáncer *(Bray 2004, Friedman 2004)*.

El sobrepeso y la obesidad surgen de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto de energía, lo que conduce a un aumento del peso corporal y de la adiposidad con hipertrofia e hiperplasia adipocitaria *(Faust y col. 1978, Arner y col. 2010)*. La hiperplasia resulta de la proliferación y posterior diferenciación a dipocitos desde preadipocitos y células madre, mientras que la hipertrofia resulta de un excesivo almacenamiento de lípidos dentro del adipocito *(Lolmede y col. 2011, Kalupahana y col. 2012)*. La hipertrofia adipocitaria conduce a la apoptosis debido a lipotoxicidad, hipoxia del tejido adiposo debido a un insuficiente suministro de sangre, activación de células inmunes residentes del tejido adiposo y subsecuente reclutamiento de células inmunes que llegan al tejido inflamado *(Cinti y col. 2005, Virtue y Vidal-Puig 2010, Odegaard y Chawla 2011)*. Estos eventos resultan en un cambio en el patrón de secreción de adipoquinas hacia un perfil predominantemente pro-inflamatorio *(Kalupahana y col. 2012)*. Las adipoquinas inflamatorias activan a quinasas como PKC y JNK, las que fosforilan a los sustratos del receptor de insulina (IRS) en serina/treonina disminuyendo la señalización de la insulina *(Vitseva y col. 2008, Holzer y col. 2011)*.

En condiciones fisiológicas, y aún más en condiciones patológicas, las adipoquinas inducen la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), generando estrés oxidativo y a su vez una mayor producción de adipoquinas. Un aumento de la incorporación de ácidos grasos en los tejidos conduce a un aumento de los metabolitos intracelulares de los ácidos grasos como el diacilglicerol, los ácidos grasos-CoA y las ceramidas. Estos metabolitos activan una cascada de quinasas de serina/treonina, posiblemente iniciado por la PKC, que resulta en la fosforilación de los IRS en serina/treonina disminuyendo su capacidad de activar a la PI3K. Como consecuencia, el transporte

de glucosa y la señalización del receptor de insulina disminuyen *(Samuel y col. 2010, Samuel y Shulman 2012)*. Además, los ácidos grasos saturados también contribuyen a la inducción de resistencia a la insulina mediada por inflamación a través de la activación de los receptores TLR (toll-like receptors). La activación de los TLR activa a NF-kB, factor de transcripción que regula positivamente a genes involucrados en vías pro-inflamatorias como IL-6 y TNF-α. El estrés oxidativo y los eventos pro-inflamatorios se encuentran estrechamente relacionados, dado que tras su activación muchas células inmunes generan radicales libres y, al mismo tiempo el aumento de las ROS promueve un estado inflamatorio *(Galassetti 2012, Marseglia y col. 2014)*.

Cuando la capacidad de almacenar lípidos del tejido adiposo se satura, se produce un depósito anómalo de grasa en tejidos no adiposos. En el músculo se observan adipocitos intramusculares y en otros tejidos como el corazón, el páncreas y el hígado se detecta una sobreacumulación de lípidos dentro de las células del órgano como así también un incremento de la masa adipocitaria en la periferia del corazón y el hígado. Esta sobreacumulación lipídica induce la producción y secreción de adipoquinas pro-inflamatorias, que junto con los efectos inflamatorios mediados por el exceso de ácidos grasos saturados inducen estrés oxidativo y resistencia a insulina también en estos tejidos no adiposos *(Guo 2014, Marseglia y col. 2014)*.

8.3. LA OBESIDAD Y EL HÍGADO

El síndrome del hígado graso no alcohólico se desarrolla en varios modelos de obesidad. Comprende un amplio espectro de alteraciones hepáticas que incluyen desde esteatosis hasta fibrosis *(Brumbaugh y Friedman 2014)*. Este síndrome no se considera una enfermedad limitada al hígado, sino que es la manifestación hepática del síndrome metabólico, el cual agrupa un número de trastornos relacionados entre sí, incluyendo a la obesidad, la diabetes, dislipemias y enfermedades del sistema cardiovascular *(Al-Rasadi y col. 2015, Fotbolcu y Zorlu 2016)*.

A nivel hepático este síndrome se define por un incremento en la deposición de lípidos, la presencia de grandes gotas lipídicas, fibrosis, inflamación, vacuolización y alteración de la función hepática *(Al-Rasadi y col. 2015)*. El hígado graso no alcohólico se caracteriza por presentar resistencia a la insulina, la cual resulta en la incapacidad de la hormona de activar la síntesis de glucógeno y de inhibir la síntesis de glucosa hepática (gluconeogénesis), lo que conduce a una mayor liberación de glucosa a la circulación. En cambio, no se evidencia resistencia a la insulina en la vía lipogénica hepática, observándose los clásicos efectos de la insulina sobre la estimulación de la lipogénesis mediada por el aumento de SRBP1 y de PPARγ *(Kerouz y col. 1997, Browning y Horton 2004, Guo 2014)*. Por otro lado, se conoce que la glucosa también regula la síntesis *de novo*

de lípidos hepática a través de la activación del factor ChREBP (elemento de respuesta a carbohidratos), factor de transcripción que estimula la glucólisis y la lipogénesis y que se encuentra aumentado en presencia de altas concentraciones de glucosa *(Yamashita y col. 2001, Iizuka y col. 2004)*. Además, la expresión del factor de transcripción PPARα se encuentra disminuida en esta patología, generando una disminución de los procesos de oxidación de ácidos grasos *(Jang y col. 2012, Mei y col. 2015)*.

El aumento en la producción de glucosa hepática y la menor captación de glucosa periférica debido a la resistencia a la insulina, aumenta los niveles de glucosa en circulación, lo que resulta en una mayor estimulación de secreción de insulina, induciendo hiperinsulinemia y aumentando todavía más la lipogénesis hepática *(Guo 2014)*. En situaciones de insulino resistencia, la alta disponibilidad de ácidos grasos en circulación y la incrementada lipogénesis *de novo*, aumenta la esterificación de ácidos grasos en triglicéridos y ésteres de colesterol y su secreción dentro de las VLDL alterando el perfil lipídico de la circulación *(Lucero y col. 2015)*.

8.4. RESISTENCIA A LEPTINA

Las concentraciones circulantes de leptina correlacionan con el índice de masa corporal (IMC) y la masa grasa total corporal, por lo que la obesidad cursa con elevados niveles de leptina circulante *(Maffei y col. 1995, Muhlhausler y col. 2007)*. Sin embargo, en modelos de obesidad y en humanos obesos se observa que la leptina es incapaz de inducir saciedad. La resistencia central a la hormona, posiblemente debida a la hiperleptinemia, la inflamación, el estrés del retículo endoplásmico y/o a alteraciones en los procesos de autofagia, se atribuye a fallas en el transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica, a alterados niveles de ObRe y/o a fallas en la señalización del receptor de leptina. Además, la disminución de receptores en la membrana celular se observa frecuentemente junto a mayores niveles de reguladores negativos como SOCS3 y PTP1B *(El-Haschimi y col. 2000, Mantzoros y col. 2011, Zhou y Rui 2013)*. También se observa que una disminución del transporte del receptor de leptina hacia la membrana plasmática y/o un aumento de su endocitosis constitutiva resulta en un menor número de receptores en membrana y se asocia a la resistencia central a la leptina en humanos y roedores obesos *(Belouzard y col. 2004, Seo y col. 2009)*. La resistencia a la leptina en la periferia se encuentra menos estudiada, se ha observado resistencia hepática a la leptina en un modelo experimental que desarrolla hígado graso no alcohólico y una falta de señalización a la hormona en hígados de ratas tratadas con leptina *(Benomar y col. 2005, Vila y col. 2008)*.

8.5. GESTACIÓN Y OBESIDAD

El sobrepeso y la obesidad materna son desórdenes metabólicos frecuentes durante el embarazo. Dado que estas patologías cursan con hiperlipidemia y resistencia a la insulina, la resistencia a insulina fisiológica hacia fines de la gestación agrava el cuadro, incrementando aún más los niveles de lípidos en circulación materna, lo que resulta en un aumento de la disponibilidad de nutrientes por parte del feto *(Farley y col. 2009, Misra y col. 2011)*. Tanto en humanos como en modelos murinos se ha observado que la administración de dietas maternas con alto contenido de grasa administrada de manera previa o durante la gestación impactan en la placenta aumentando los transportadores de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos, lo que resulta en un incremento del transporte placentario de nutrientes y del crecimiento fetal *(Jones y col. 2009, Jansson y col. 2013, Diaz y col. 2015)*. En humanos son frecuentes los neonatos con valores de peso, longitud o diámetro de circunferencia de cabeza por encima del percentilo 90 en relación a la edad gestacional o macrosómicos (neonatos con peso superior a 4,5 kg) *(Frederick y col. 2008, Kim y col. 2014)*. En modelos murinos de sobrepeso y obesidad también se observa placentomegalia y macrosomía *(Jones y col. 2009, Rosario y col. 2016)*.

Un alterado ambiente materno durante el embarazo debido a situaciones como la hipoxia, el estrés y la obesidad, entre otros, influye en el desarrollo fetal, pudiendo predisponer al feto a desarrollar enfermedades en la vida posnatal (Boney y col. 2005, Brenseke y col. 2013). Se ha evidenciado que la descendencia de madres obesas o con sobrepeso presenta un incremento en la concentración sérica de lípidos, leptina e insulina (Catalano y col. 2009). Se ha observado que los hijos de madres que incrementan su IMC entre un embarazo y otro presentan mayor peso al nacer y mayor riesgo de desarrollar alteraciones metabólicas (Villamor y Cnattingius 2006). Asimismo, los hijos de madres obesas presentan mayor índice de alteraciones metabólicas que sus hermanos nacidos posteriormente a una cirugía bariátrica y a la recuperación de la salud metabólica materna (Kral y col. 2006). Esta evidencia sugiere que la exposición al entorno intrauterino de una mujer obesa o con sobrepeso induce un mayor riesgo de desarrollar un fenotipo obeso y alteraciones metabólicas asociadas a estas patologías en la etapa posnatal (Taylor y Poston 2007).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS GENERAL

El sobrepeso materno generado por una dieta con un exceso de grasas saturadas produce alteraciones en la placenta e hígado fetal que persisten en el hígado de la descendencia. Estas alteraciones se encuentran asociadas a una desregulación en el accionar de leptina.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

- ✓ La administración de una dieta con exceso de grasas saturadas de manera previa y durante la gestación y la lactancia en la rata genera sobrepeso materno e incrementa los niveles plasmáticos de triglicéridos, insulina y leptina, conformando un modelo válido para el estudio de alteraciones metabólicas en la placenta, el feto y la descendencia.

- ✓ La administración de una dieta con exceso de grasas saturadas de manera previa y durante la gestación y la lactancia en la rata induce un incremento del peso placentario y fetal y un aumento de los niveles circulantes de lípidos fetales.

- ✓ La administración de una dieta con exceso de grasas saturadas de manera previa y durante la gestación y la lactancia en la rata impacta sobre el hígado fetal generando daño inducido por estrés oxidativo y nitrativo y alteraciones en el metabolismo de lípidos y de detoxificación, alteraciones que persisten en el hígado de la descendencia.

- ✓ Alteraciones en el accionar de la leptina participan en la inducción de anomalías del catabolismo lipídico en los hígados de fetos provenientes de ratas que recibieron la dieta con exceso de grasas saturadas.

OBJETIVOS

1- **Establecer un modelo de sobrepeso en rata mediante la alimentación con una sobrecarga de grasas saturadas en la dieta, con el fin de estudiar los efectos de las alteraciones metabólicas asociadas al sobrepeso materno sobre la placenta, el feto y la descendencia.**

   a) Evaluar en las ratas gestantes el peso corporal y los niveles plasmáticos de lípidos, glucosa, leptina, insulina y la resistencia a insulina.

   b) Evaluar el peso fetal y placentario y los niveles plasmáticos fetales de lípidos, glucosa, leptina, insulina y resistencia a insulina.

2- **Estudiar el efecto de la dieta materna con exceso de grasas saturadas sobre la placenta.**

   a) Evaluar en la placenta de rata gestante control y con sobrepeso la producción de óxido nítrico y los niveles de peroxidación lipídica, parámetros indicadores de daño inducido por estrés oxidativo.

   b) Evaluar en la placenta de rata gestante control y con sobrepeso los niveles de lípidos tisulares, los niveles de ARN mensajero de lipasas, del receptor de insulina, de leptina y sus receptores, parámetros relacionados al metabolismo lipídico placentario.

3- **Estudiar el efecto de la dieta materna con exceso de grasas saturadas sobre el hígado fetal.**

   a) Evaluar en el hígado de fetos de rata gestante control y con sobrepeso los niveles de lípidos, la expresión del receptor de insulina, de leptina y sus receptores y de genes involucrados en el catabolismo de lípidos (PPARα, ACO, CPT1 y LPL), parámetros relacionados al metabolismo de lípidos.

   b) Evaluar en el hígado de fetos de rata gestante control y con sobrepeso la producción de óxido nítrico, los niveles de peroxidación lipídica y de proteínas nitradas, parámetros indicadores de daño inducido por estrés oxidativo y nitrativo.

   c) Evaluar en el hígado de fetos de rata gestante control y con sobrepeso los niveles de ARN mensajero de genes involucrados en la detoxificación (Nrf2, MRPs) y la actividad plasmática de las enzimas fosfatasa alcalina y transaminasa glutámico oxalacética, marcadores de daño y disfunción hepática.

4- Estudiar el efecto de la leptina fetal sobre la placenta y el hígado fetal.

a) Evaluar en la placenta de fetos control administrados con leptina la capacidad de la leptina de modular los niveles de ARN mensajero de lipasas y de los receptores de insulina y de leptina.

b) Evaluar en el hígado de fetos control administrados con leptina la capacidad de la leptina de modular los niveles de ARN mensajero de los receptores de insulina y de leptina y de genes involucrados en el catabolismo de lípidos (PPARα, ACO, CPT1 y LPL).

5- Estudiar el efecto de leptina sobre el catabolismo de lípidos en explantos de hígados de fetos de ratas control y ratas alimentadas con exceso de grasas saturadas cultivados en presencia de leptina.

Evaluar en el hígado de fetos provenientes de ratas control y con sobrepeso cultivados en presencia o ausencia de leptina, los niveles de lípidos, la expresión del receptor de leptina y los niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el catabolismo de lípidos (PPARα, ACO, CPT1 y LPL).

6- Estudiar el efecto de la dieta con exceso de grasas saturadas sobre el hígado de crías de 21 y 140 días de edad.

a) Evaluar en las crías de 21 y 140 días de edad provenientes de ratas control y de ratas con sobrepeso el peso corporal y hepático y los niveles plasmáticos de lípidos y glucosa; y en las crías de 140 día de edad los niveles plasmáticos de insulina y leptina.

b) Evaluar en los hígados de las crías provenientes de ratas control y de ratas con sobrepeso los niveles de lípidos, los niveles de ARN mensajero del receptor de insulina, de leptina y sus receptores, y de genes involucrados en el catabolismo de lípidos (PPARα, ACO, CPT1 y LPL), parámetros relacionados al metabolismo de lípidos.

c) Evaluar en los hígados de las crías provenientes de ratas control y de ratas con sobrepeso la producción de óxido nítrico, los niveles de peroxidación lipídica y de proteínas nitradas, parámetros indicadores de daño inducido por estrés oxidativo y nitrativo.

d) Evaluar en los hígados de las crías provenientes de ratas control y de ratas con sobrepeso los niveles de ARN mensajero de genes involucrados en la detoxificación (Nrf2, MRPs) y la actividad plasmática de la fosfatasa alcalina y la transaminasa glutámico oxalacética, marcadores de daño y disfunción hepática.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.MATERIALES

1.1. Sales y solventes

Sales

ClNa, Na_2CO_3, $NaHCO_3$, $MgSO_4$, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, K_2HPO_4, KH_2PO_4, ClK, $MgCl_2$, $CaCl_2$, Glucosa, (SIGMA, MALLINKRODT).

Solventes

Acetona, ácido acético, cloroformo, etanol, éter etílico, formaldehído, glicerol, hexano, metanol, xilol (ANEDRA, BIOPACK, MERCK).

Soluciones y medios de incubación

Medio Krebs-Ringer bicarbonato salino con capacidad buffer (KRB): Glucosa 5.5 mM Na^+ 145mM, Cl^- 127 mM, $HCO3^-$ 25mM, Mg^{2+}, $SO4^{2-}$ y $PO4^{2-}$ 1.2 mM.

Medio fosfato salino (PBS): K_2HPO_4 1.5 g/l, KH_2PO_4 0.2g/l, NaCl 7.75 g/l.

Buffer citrato (SIGMA).

Solución de fijación de tejido: formaldehído al 4% en PBS.

Solución para medición de proteínas: reactivo de Bradford (BIORAD).

Hematoxilina de Mayer (ÁLWIK).

Buffer Tris: Tris-HCl, 100 mM (pH 7.5).

Solución de fijación de ácidos nucleicos: RNA later® (Ambion).

Solución utilizada para la determinación de los niveles de lípidos: Bligh-Dyer (Cloroformo 1: MeOH 2).

TBS: Trizma base 25mM, NaCl 136.7mM, KCl 2.68mM, pH 7.4.

T-TBS: TBS + 0.05% Tween-20.

Buffer de lisis: Tris-HCl 20mM, NaCl 150mM, Triton X-100 1% v/v, cóctel de inhibidores de proteasas 2% v/v (pH 7.4).

Buffer muestra 4X: Trizma base 10mM, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.06%, β-mercaptoetanol 5%.

Buffer de Transferencia: Trizma base 20mM, glicina 150mM, metanol 20%, pH 8.8.

Buffer de corrida para PCR (TAE): TAE: Tris 242 g/L, EDTA 37,2 g/L, Ácido acético glacial 57,1 mL/L; pH 8.

Solución de bloqueo: 1% de BSA en TBS.

Medio fosfato salino (PBS): K2HPO4 1.5 g/l, KH2PO4 0.2g/l, NaCl 7.75 g/l.

1.2. Drogas y reactivos

Acrilamida, N' N' bis-metil-acrilamida, glicina, dodecilsulfato de sodio (SDS), tris (hidroximetil)-aminometano (Tris), azul de bromofenol, glicina (BIORAD), rojo ponceau, hematoxilina (BIOPUR), tetrametilenetilendiamina (TEMED), ácido tiobarbitúrico (TBA), malonildialdehído (MDA), 3,3' diamino-benzidina (DAB), seroalbúmina bovina (BSA), Tri Reagent (MOLECULAR RESEARCH) tetra acetato de etilendiamina (EDTA) (SIGMA), cóctel de inhibidor de proteasas (SIGMA-ALDRICH), ácido tricloro acético (TCA) (SIGMA-ALDRICH), peróxido de hidrógeno (MALLINCKRODT), persulfato de amonio, β-mercaptoetanol (PROMEGA), Syber Safe (INVITROGEN), Eva Green (BIOTIUM), fosfolípidos (mezcla de fosfatidilserina y fosfatidilcolina), colesterol, triglicéridos, ésteres de colesterol (SIGMA-ALDRICH), Leptina (SIGMA-ALDRICH), Tween-20 (MERCK), Triton X-100 (ROHM & HAAS), agarosa (BIODYNAMICS), dNTP (INVITROGEN), M-MLV (PROMEGA), Go Taq Green Mater Mix (PROMEGA), GoTaq Polimerasa (PROMEGA), suero normal de cabra (Vector Laboratories).

1.3. Anticuerpos

Anticuerpos primarios	Tipo/Especie en donde se desarrolló
Anti-Nitrotirosina (Millipore)	Policlonal/conejo
Anti-ObR (Abcam)	Policlonal/conejo
Anti-RI (Cell Signalling)	Policlonal/ratón
Anti-PPARα (Abcam)	Policlonal/ratón
Anti-Actina (Abcam)	Policlonal/ratón

Tabla 1: Anticuerpos primarios utilizados para Inmunohistoquimica y Western blot. ObR: receptor de leptin, RI: receptor de insulina, PPARα: receptores activados por proliferadores peroxisomales α.

Anticuerpos secundarios utilizados para IHQ	Especie en donde se desarrolló
Anti IgG de conejo biotinilado	Cabra
Anticuerpos secundarios utilizados para Western blot	
Secundario contra ratón (Bio Rad)	Cabra
Secundario contra conejo (Bio-Rad)	Cabra

Tabla 2: Anticuerpos secundarios utilizados para Inmunohistoquimica (IHQ) y Western blot.

1.4. Equipos comerciales de determinación colorimétrica

Determinación de Insulina (Mercodia).

Determinación de Leptina (TiterZyme EIA rat leptin; Assay Designs, Ann Arbour).

Determinación de triglicéridos, colesterol y glucosa (Wiener Lab).

Determinación de niveles de nitratos nitritos (Cayman).

Determinación de enzimas hepáticas (Wiener Lab).

1.5. Equipos comerciales de revelado

Kit de quimioluminiscencia para revelado de Western blot: SuperSignal West Pico o Femto (Pierce, Thermo Scientific)

Kit de revelado con el complejo avidina-biotina (Vector Laboratories)

1.6. Programas de análisis de imagen

Image J, Image ProPlus, DigiDoc 1000, Rotor Gene Q.

1.7. Programa de análisis estadístico

Graphpad prism 5.

1.8. Otros

Manteca (Sancor), tiras reactivas y sensor Accu-Check (ROCHE), portaobjetos para inmunohistoquímica, parafina (BIOPACK), placas de cromatografía en capa delgada de sílica-gel preparadas sobre vidrio, membranas de nitrocelulosa, lápiz hidrofóbico (DAKO), pegamento fijador de cubre-objetos Entellan (SIGMA), membranas de nitrocelulosa (SIGMA), marcador de peso molecular PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Invitrogen),marcador de peso molecular para PCR (NOVAGEN).

2. MÉTODOS

2.A. Animales

Ratas hembra albino Wistar fueron adquiridas en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y mantenidas en el bioterio del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos con libre acceso al alimento balanceado (Asociación Cooperativa Argentina, Buenos Aires, Argentina) y al agua. Los ciclos de luz-oscuridad fueron de 14 y 10 horas respectivamente, la temperatura de 20 °C y humedad constante. El cuidado y uso de los animales ha seguido las normas de la guía de la Institución local, basada en las pautas del National Institute of Health (NIH) especificadas en "Principles of Laboratory Animal Care, NIH publication N° 85-23, revised 1985".

2.A.1. Tratamientos dietarios: modelo materno de sobrepeso

A las 6 semanas de edad 28 ratas hembra fueron separadas en dos grupos: 14 ratas formaron parte del grupo control (CT), que fue alimentado con una dieta comercial estándar (5% de lípidos). Las restantes 14 ratas fueron alimentadas con la dieta comercial estándar suplementada con un 25% de grasas saturadas de origen animal a través del agregado de manteca derretida (Sancor Co., Buenos Aires, Argentina) a los pellets de alimento. El alimento con el agregado de manteca fue analizado por el servicio de análisis de alimentos para el rotulado nutricional del INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial) y del INAL (Instituto nacional de alimentos). Este grupo fue llamado "grupo alimentado con dieta con exceso de grasas saturadas" o DGS. En la **Tabla 3** se muestra la composición nutricional de ambas dietas y en la **Tabla 4** el porcentaje de calorías aportadas por cada componente dietario. Las ratas de los grupos CT y DGS recibieron las respectivas dietas durante 8 semanas, luego de las cuales fueron apareadas con machos control alimentados con dieta comercial estándar (CT). La observación de espermatozoides en el extendido vaginal determinó el día 1 de gestación. El 97% de las ratas se preñaron dentro de los diez días de apareo. Las ratas que no fueron preñadas dentro de este lapso de tiempo fueron excluidas del experimento. Los tratamientos dietarios continuaron a lo largo de la preñez.

	Dieta Control (CT)	Dieta Grasas Saturadas (DGS)
Proteínas (g)	22	21
Carbohidratos (g)	47	41
Grasas (g)	5	27
Energía (Kcal)	352	522

Tabla 3: Composición nutricional de los tratamientos dietarios cada 100 g de alimento.

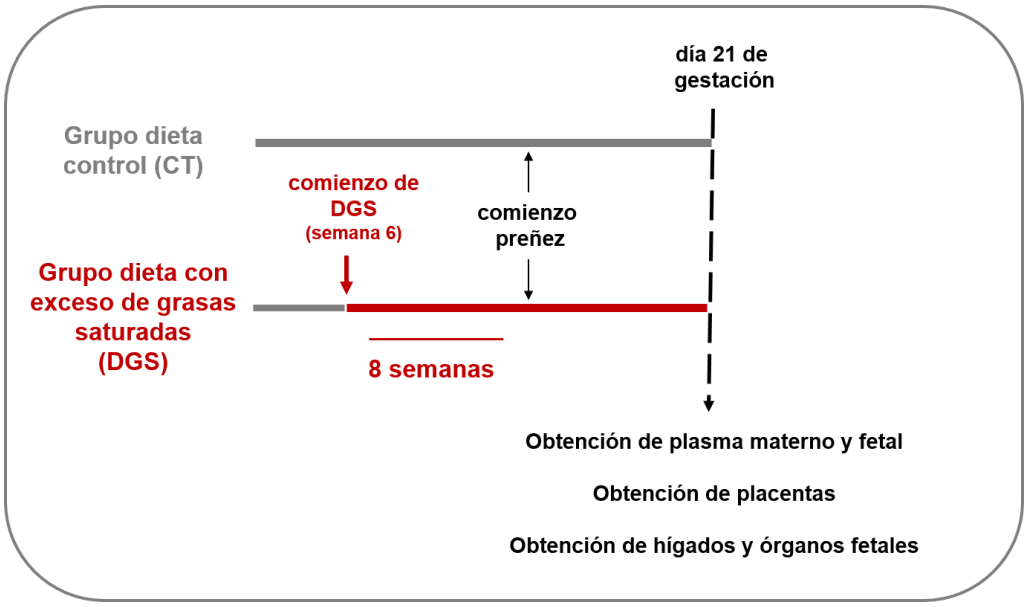
	Dieta Control (CT)	Dieta Grasas Saturadas (DGS)
Proteínas (% Kcal)	28,1	18,1
Carbohidratos (% Kcal)	60,1	35,3
Grasas (% Kcal)	12,8	46,5
Energía (Kcal/100g)	352	522

Tabla 4: Porcentaje de calorías sobre total de calorías.

2.A.2. Obtención de plasma materno y fetal, placentas y órganos fetales

En el día 21 de gestación (un día previo al parto) se realizó la eutanasia de las ratas de ambos grupos dietarios. Los animales fueron levemente anestesiados en una cabina saturada de CO_2, luego se colectó la sangre materna mediante decapitación. Inmediatamente después se llevó a cabo la cesárea y se removieron las placentas y los fetos. Las placentas fueron guardadas a -80°C o en solución de fijación de ARN (RNA later®) a -80°C. La sangre fetal fue colectada mediante decapitación. El plasma fetal y materno fue obtenido luego de la centrifugación de la sangre en tubos conteniendo heparina y guardado a -80°C. La sangre de cada feto fue centrifugada por separado y luego se juntó en un mismo eppendorf el plasma proveniente de los fetos hembra de cada madre y en otro eppendorf el de los fetos macho, obteniéndose así una muestra de plasma de fetos hembra y una de fetos macho por cada camada. Los órganos fetales fueron removidos bajo un esteromicroscopio utilizando material de disección. Luego, los hígados fetales fueron guardados en etanol (luego de haber sido sumergido durante 48 hs en formol), a -80°C, en solución RNA later® a -80°C o incubados en presencia o ausencia de leptina como se explica a continuación. (**Esquema 12**). Cada rata gestante representó un número experimental, y por cada una se obtuvieron los fetos hembra con su correspondiente placenta y órganos y los fetos macho con su correspondiente

placenta y órganos. Las placentas y los hígados fetales se preservaron de acuerdo a la técnica a desarrollar. Se utilizó un n=12 para cada grupo dietario para las determinaciones de peso, eficiencia placentaria, trigliceridemia, colesterolemia y glucemia fetal (utilizándose el promedio obtenido para cada camada como dato experimental), mientras que se trabajó con un n=6 para el dosaje de insulina y leptina plasmática fetal y para las restantes determinaciones realizadas en la placenta y el hígado fetal.

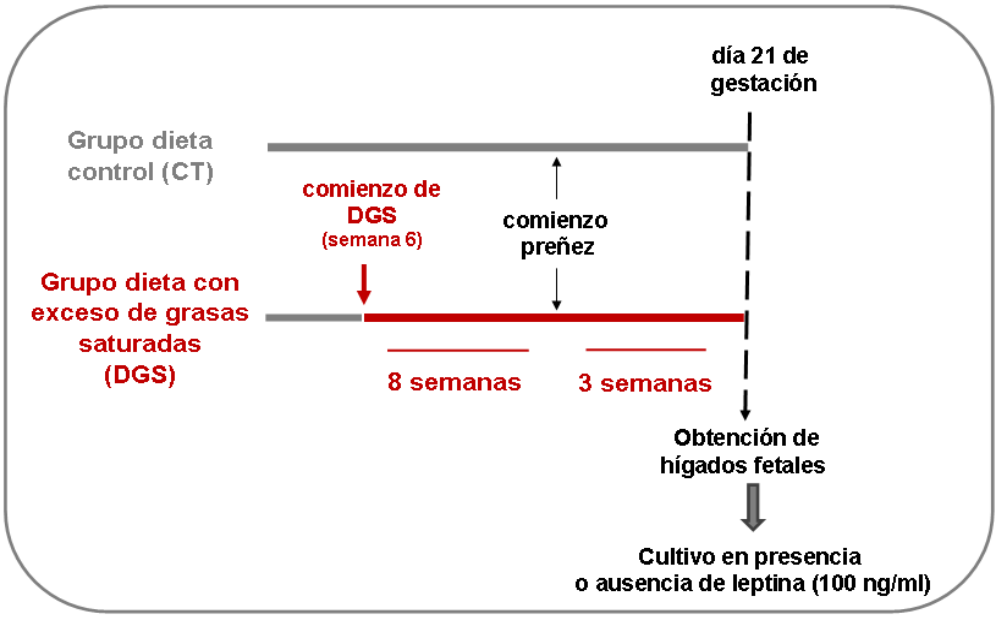


Esquema 12: Modelo experimental para la obtención de plasma materno y fetal, placentas e hígados y órganos fetales provenientes del grupo de ratas control (CT) y del grupo de ratas alimentado con exceso de grasas saturadas (DGS).

2.A.3. Cultivo de explantos fetales con leptina

Las ratas cuyos fetos no fueron utilizados para las determinaciones mencionadas en el punto 2.A.2 se utilizaron para la obtención de fetos hembra y macho. Los hígados de los fetos provenientes de ratas de ambos grupos dietarios fueron cultivados, por separado, durante 3 horas en baño metabólico bajo atmósfera controlada (CO2: 5%; O2: 95%) a 37 ºC, en 1ml de medio KRB, en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml). Luego los hígados fetales fueron guardados a -80°C o en solución RNA later® a -80°C hasta el momento de las determinaciones. En este modelo experimental obtuvimos 4 grupos de trabajo: 1) hígados fetales provenientes de ratas alimentadas con dieta control cultivados en ausencia de leptina (grupo CT sin adición: CT s/a); 2) hígados fetales provenientes de ratas alimentadas con dieta control cultivados en presencia de leptina (CT+leptina); 3) hígados fetales

provenientes de ratas alimentadas con dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) cultivados en ausencia de leptina (grupo DG sin adición: DGS s/a); 4) hígados fetales provenientes de ratas alimentadas con exceso de grasas saturadas (DGS) cultivados en presencia de leptina (DGS+leptina) (**Esquema 13**). Cada rata gestante representó un número experimental. Se utilizó un n=6 para cada uno de los cuatro grupos anteriormente descriptos.

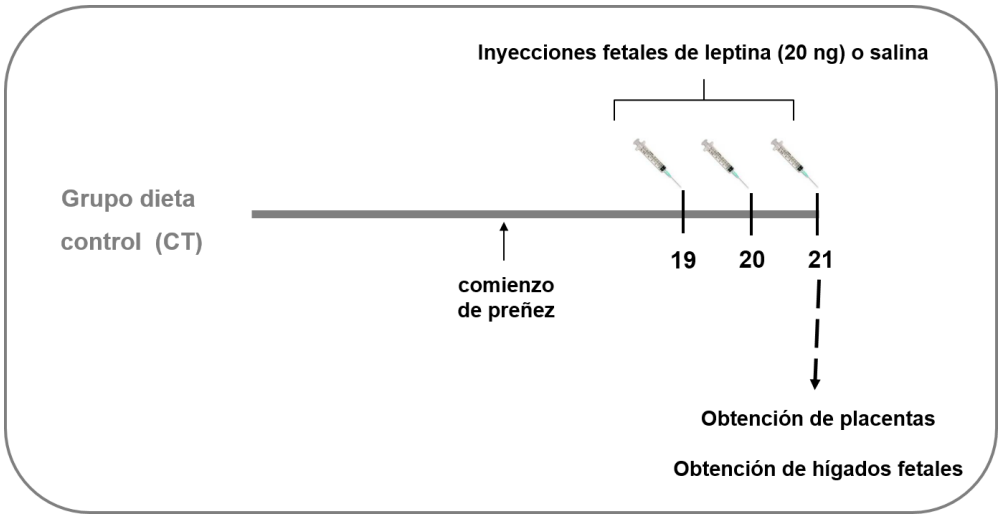


Esquema 13: Modelo experimental para la obtención de explantos fetales provenientes del grupo de ratas control (CT) y de ratas alimentadas con exceso de grasas saturadas (DGS) cultivados en presencia de leptina.

2.A.4. Administración intra-fetal de leptina en ratas control

Se realizó un segundo grupo experimental compuesto por ratas control (CT). En el día 19 de gestación, un grupo de ratas CT fue anestesiado en cabina de CO_2. Bajo los efecto de vapores de éter se realizó una incisión en el abdomen y se expuso el cuerno izquierdo uterino. Se utilizaron sólo aquellos animales que poseían entre cinco y siete fetos en el cuerno izquierdo uterino. Los fetos fueron numerados comenzando desde el ovario y alternativamente inyectados de manera subcutánea a través de la pared uterina con 50 µl de salina (grupo CT+salina) o leptina (20 ng) (grupo CT+leptina). Luego de las inyecciones el cuerno uterino fue introducido en la cavidad abdominal y las capas de músculo y de piel fueron suturadas independientemente. La cirugía tuvo una duración de 10 minutos y luego de 15 minutos de finalizada los animales lograron recuperarse completamente. Este procedimiento fue repetido en los días 20 y 21 de gestación (**Esquema 14**). En el día 21 de gestación, 3 horas después de aplicadas las inyecciones, las madres fueron sacrificadas y

se llevó a cabo la obtención, pesaje y guardado de las placentas y los hígados fetales como se detalló anteriormente. La elección de la concentración de leptina utilizada se basó en estudios previos *in vitro* que mostraron un efecto de 20 ng/ml de leptina sobre el metabolismo placentario y fetal *(White y col. 2004, White y col. 2006)*. Además, estudios similares han demostrado que una única administración s.c. de 80 ng leptina/g en ratas adultas triplica los valores de leptinemia *(Oliveira y col. 2007)*. El valor de leptina en circulación fetal 3 horas después de la última inyección de leptina fue notablemente mayor respecto del de los fetos inyectados con el vehículo. Cada rata gestante representó un número experimental, y por cada rata gestante se obtuvieron, al azar, fetos hembra con su correspondiente placenta e hígados y fetos macho con sus correspondientes placentas e hígados. Se utilizó un n=6 para cada grupo experimental ((grupo CT+salina) y (grupo CT+leptina)) para realizar las determinaciones.

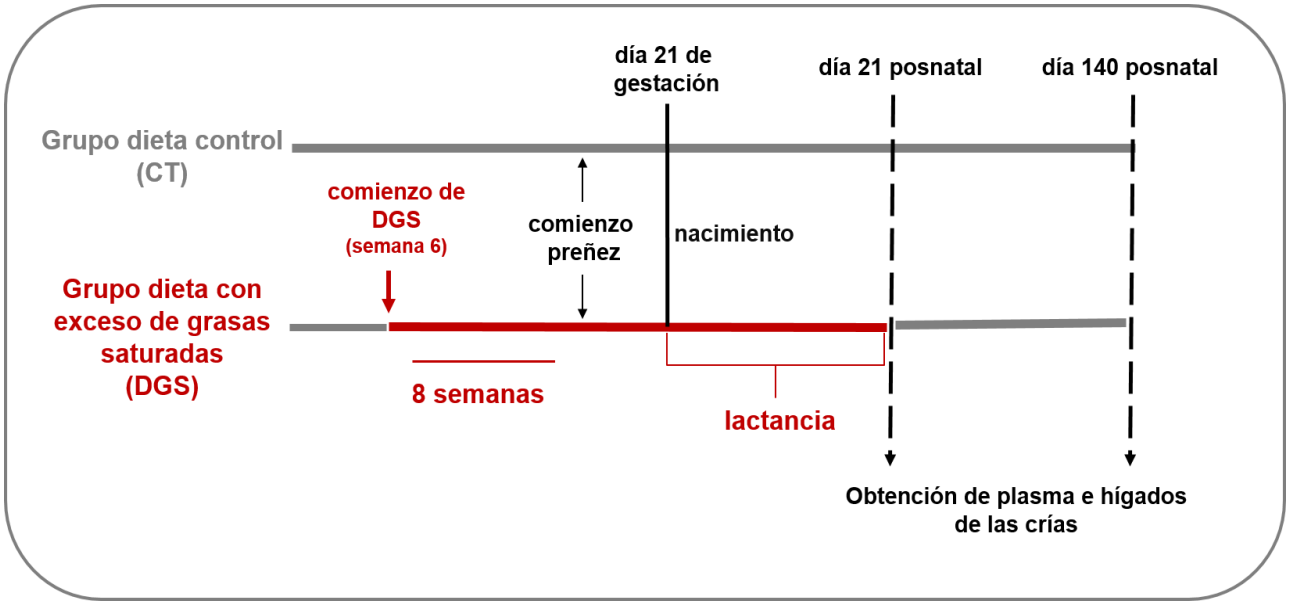


Esquema 14: Modelo experimental para la obtención de placentas e hígados provenientes de fetos control inyectados con leptina.

2.A.5. Estudios en la descendencia de rata

Con el objetivo de estudiar alteraciones metabólicas debidas al exceso de grasas saturadas en la dieta materna en la descendencia de rata, se realizó un tercer modelo experimental en el cual se permitió que un grupo de ratas gestantes del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) finalizaran la preñez y tuvieran sus crías. Las camadas se ajustaron a 5 crías hembra y 5 crías macho. Los tratamientos dietarios maternos correspondientes continuaron hasta la finalización del período de lactancia (día 21 posnatal). Un primer grupo de crías, proveniente tanto del grupo CT como del grupo DGS, fue sacrificado a los 21 días de edad. Las crías restantes de

ambos grupos dietarios fueron separadas de sus madres y situadas en jaulas diferentes según su sexo, continuando su crecimiento bajo una dieta comercial estándar (CT). A la edad de 140 días fueron sacrificadas. Tanto en el día 21 como 140 posnatal las crías fueron pesadas y luego de realizada la eutanasia se obtuvo el plasma e hígado, los que fueron guardados en etanol (luego de haber sido sumergido durante 48 hs en formol), a -80°C o en solución RNA later® a -80°C para posteriores determinaciones (**Esquema 15**). Cada rata gestante representó un número experimental, y por cada rata gestante se obtuvo, al azar, una cría hembra y una cría macho para crealizar las determinaciones. Se utilizó un n=6 para cada grupo dietario.



Esquema 15: Modelo experimental para el estudio de la descendencia de rata alimentada con dieta control (CT) o con dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).

2.B. Determinaciones

2.B.1. Determinación de proteínas

La determinación de proteínas de las muestras fue realizada según la técnica descripta por Bradford *(Bradford 1976)*. Se tomó una alícuota de 10 µl de tejido homogeneizado y se realizó una dilución de aproximadamente 1:10 dependiendo del tejido utilizado. Se tomaron 10 µl de la dilución y se mezclaron con 1 ml de solución de reactivo de Bradford. Luego de 5 minutos se determinó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595nm. La concentración proteica de la muestra se calculó mediante la comparación de la absorbancia obtenida con una curva de calibración realizada utilizando seroalbúmina bovina en diferentes concentraciones como estándar.

2.B.2. Determinación de la producción de óxido nítrico (ON)

El óxido nítrico es un agente altamente reactivo y de vida media muy corta debido a que es rápidamente metabolizado por oxidación. Los productos de oxidación son los nitratos y los nitritos, metabolitos estables del NO. Por esta razón, la medición de nitratos/nitritos es empleada como índice de la producción de óxido nítrico a nivel tisular *(Baylis y Vallance 1998)*. Los tejidos conservados a -80°C fueron descongelados y homogeneizados en 1ml de buffer Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una alícuota fue separada para la determinación de proteínas y el homogenato restante fue centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Luego 40µl del sobrenadante fueron utilizados para la determinación de nitratos/nitritos mediante un kit comercial: los nitratos fueron reducidos a nitritos por acción de la enzima nitrato reductasa y los nitritos totales resultantes fueron cuantificados por el método de Griess *(Green y col. 1982)*. La densidad óptica fue medida a 540 nm en microplaca. Se utilizaron $NaNO_3$ y $NaNO_2$ como estándares. Los resultados fueron expresados en nmoles de nitrato/nitrito x mg proteínas^{-1} (nmoles NN/mg prot).

2.B.3. Determinación de los niveles de lipoperóxidos

Los lipoperóxidos fueron evaluados como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) *(Jha y col. 1985)*, por cuantificación de malondialdehído (MDA), producto de dicha reacción. Por cada muestra, 100 mg de tejido fue homogeneizado en buffer 100 Tris-HCl mM, pH 7.6. Se adicionó a los homogenatos ácido tricloroacético (40% v/v) y luego se los centrifugó a 3.000 rpm por 10 min. A continuación se agregó al sobrenadante un volumen equivalente de ácido tiobarbitúrico (46 mM), y la solución fue calentada a 95 °C por 15 min. Luego se detuvo la reacción enfriando las muestras y el color desarrollado por cada una de ellas fue medido en espectrofotómetro a 530 nm. Diferentes concentraciones de MDA fueron procesadas en las mismas condiciones que los homogenatos tisulares para realizar una curva estándar. Los resultados fueron expresados como nmol de TBARS x mg de proteínas^{-1} (nmoles TBARS/mg prot).

2.B.4. Determinación de los niveles de lípidos

La extracción de lípidos del tejido se realizó según el método de Bligh y Dyer *(Bligh y Dyer 1959)*. Las placentas y los hígados (100 mg en ambos casos) se homogeneizaron en 1000 µl de PBS,

de los cuales 500 µl se sometieron a dos rondas de extracciones con 3.5ml de la mezcla de solventes Bligh-Dyer (Cloroformo 1:MeOH 2). Se particionó el volumen de extracción con 1 ml de agua y 1 ml de cloroformo, y posteriormente al centrifugado, se descartó la fase superior acuosa y la fase orgánica se evaporó a sequedad en un equipo concentrador. El residuo se reconstituyó con 1 ml de mezcla Bligh-Dyer. Volúmenes equivalentes al mismo contenido de proteína fueron evaporados, reconstituídos en 25 µl de Bligh-Dyer y desarrollados en placas de sílica gel mediante la técnica de cromatografía en capa delgada. Junto a las muestras se desarrolló también una curva estándar conteniendo cantidades conocidas de las distintas especies lipídicas a analizar. La mezcla de solventes para el desarrollo de la placa fue hexano: éter: ácido acético en partes 80:20:2, v:v:v. Las placas se desarrollaron y posteriormente se reveló la presencia de las distintas especies lipídicas con vapores de yodo. El yodo se combina con las moléculas hidrofóbicas, evidenciando la presencia de los lípidos por la aparición de manchas marrones. Estas imágenes fueron digitalizadas por medio de un escáner y se procedió al análisis de la intensidad y área de las manchas utilizando el programa de computación Image J. Los valores obtenidos se refirieron a la curva realizada con las lecturas de las imágenes obtenidas de las distintas especies lipídicas estándares sembradas en cantidades conocidas. Los resultados se expresaron como µg de especie lipídica/mg proteína.

2.B.5. Determinación de niveles de ObR, RI y PPARα mediante Western blot

Los tejidos fueron homogeneizados, sonicados durante 10 segundos en 300 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 20mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1% v/v, cóctel inhibidor de proteasas 2% v/v, pH 7.4) e incubadas a 4 °C por 2 horas. Posteriormente se realizó una centrifugación a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos, recuperándose la fracción soluble para la evaluación de los niveles de proteínas mediante la técnica de Western blot *(Federici y col. 2001)*. De cada muestra se tomó una alícuota de volumen equivalente a 100 µg de proteínas y se lo diluyó en buffer muestra 4X (Trizma base 10 mM, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.06%, β-mercaptoetanol 5%). Antes de la siembra, las muestras fueron sometidas a 100°C durante 3 minutos con el objetoivo de desnaturalizar las proteínas.

Las muestras fueron sembradas en un gel SDS-PAGE (4-20%) en condiciones desnaturalizantes. Finalizada la electroforesis los geles fueron lavados en buffer de transferencia (Trizma base 20 mM, glicina 150 mM, metanol 20%, pH 8.8), con el objeto de eliminar el SDS remanente. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.2µm (Trans-Blot Turbo Mini Nitrocellulose Transfer Membrane, BioRad) utilizando el sistema Trans-Blot Turbo

Transfer (BioRad). Finalizada la transferencia la membrana fue incubada durante 60 minutos con solución de bloqueo (1% de BSA en TBS: Trizma base 25 mM, NaCl 136.7 mM, KCl 2.68 mM, pH 7.4) y posteriormente incubada con el anticuerpo primario correspondiente (24 hs a 4°C) (**Tabla 1**). Luego se realizaron los lavados (3 de 10 minutos con T-TBS y 3 de 10 minutos con TBS) para eliminar el anticuerpo no unido de manera específica y finalmente se incubó la membana durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 2**). Los anticuerpos utilizados fueron anti-ObR (1/1000 en placenta, 1/2000 en hígado fetal), anti-RI (1/200 en hígado fetal), anti-PPARα (1/500 en hígado fetal), anti-actina (1/20000). Se realizaron nuevamente los lavados de la membrana y se procedió a detectar la señal mediante el agregado de la solución reveladora SuperSignal West Pico o Femto (Pierce, Thermo Scientific). Se utilizaron estándares de peso molecular y un control negativo realizado por omisión del anticuerpo primario. Las membranas fueron cortadas permitiendo la detección de la proteína de interés en una sección de la membrana y de la proteína actina en otra sección de la membrana, en ensayos independientes. En los casos en los que la misma membrana se utilizó para determinar a dos proteínas diferentes, la membrana fue sometida a remoción del anticuerpo primario, incubándola durante 1 h a 50 °C con una solución de 62,5 mM Tris, 100 mM β-mercaptoetanol y 2% de SDS, pH 6,2. Luego de este proceso la membrana fue incubada con solución de bloqueo toda la noche y posteriormente con el anticuerpo primario de la segunda proteína a detectar. La intensidad de las bandas fue analizada empleando el programa Image J o DigiDoc 1000, teniendo en cuenta tanto la superficie como a la intensidad de las mismas, expresándose en unidades densitométricas arbitrarias relativas al control, luego de normalizarlo según el valor densitométrico correspondiente a la actina.

2.B.6. Inmunolocalización de ObR y residuos de nitrotirosina

Los explantos placentarios y hepáticos fueron fijados en formaldehído (4% en PBS) durante 48 horas y luego conservados en alcohol 70%. Los explantos fueron deshidratados utilizando alcoholes de graduación ascendente: etanol 70%, etanol 80%, etanol 90% y etanol 100%. Previamente a la inclusión en parafina, se realizó la aclaración del órgano, utilizando xilol como solvente intermediario. Posteriormente se realizó la inclusión en parafina de los explantos deshidratados y se incubó por 12 horas en estufa a temperatura constante (56°C). Finalizado este período, se dispuso el tejido en cubos de parafina líquida y se los dejó solidificar a temperatura ambiente. Una vez que los cubos de parafina se encontraron solidificados, se realizaron cortes de 5µm de espesor con un micrótomo y se los colocó sobre portaobjetos para inmunohistoquímica. Los cortes obtenidos a partir del procesamiento histológico fueron utilizados para realizar los ensayos de

inmunohistoquímica, utilizándose para cada caso los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes (**Tabla 1 y 2**). Los cortes fueron desparafinados en xilol (2 veces durante 10 minutos). A continuación se realizó la hidratación con lavados sucesivos en etanol de concentraciones decrecientes: 100 %, 90%, 80% y 70% y un último lavado en agua destilada. Una vez finalizada la hidratación, se inhibió la peroxidasa endógena con una solución 0.5% de peróxido de hidrógeno en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, ya que el sistema de revelado se fundamenta en interacciones con peroxidasas exógenas. Posteriormente los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluidos en PBS-tween (0.05%)-BSA (1%) en cámara húmeda durante 24 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos utilizados fueron anti-ObR (1:600 en placenta, 1/600 en hígado), anti-nitrotirosina (1:5000 en hígado fetal y de cría de 140 días de edad, 1/20000 en hígado de cría de 21 días de edad). Luego de ese período se lavó con PBS el anticuerpo primario excedente y se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios fueron utilizados en una dilución 1:200 en suero normal diluido 1:66 en PBS-tween. Luego de los lavados se agregó el complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC) en una dilución de 1:100 en PBS, y se incubó durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. A continuación se lavó y reveló la presencia antígeno mediante el agregado del sustrato de la peroxidasa (peróxido de hidrógeno 0,01%) y DAB (0.04% en Tris 0.06 M pH 7,4). La enzima peroxidasa cataliza la oxidación del DAB produciéndose una coloración marrón en el área de la inmunomarcación. La reacción para el revelado fue detenida luego de 10 minutos con agua. El control negativo se realizó procesando los cortes en ausencia del anticuerpo primario. Finalmente se deshidrataron los cortes sometiéndolos a: etanol 70 %, etanol, 80%, etanol 90% etanol 100% (10 minutos en cada uno), y 3 veces xilol 100% (10 minuto). Se colocó fijador Entellan sobre el corte y se tapó con un cubreobjetos.

Para el análisis de las imágenes, la densidad óptica de la marca fue medida en un microscopio óptico Nikon, equipado con una cámara de captura directa de imagen conectada al programa Canon Remote Capture y analizada con el programa ImageProPlus. La densidad óptica fue evaluada tomando una misma área para todas las muestras, la cual se repitió 3 veces por campo, tomando 5 campos por corte, y se hicieron 3 cortes por muestra. El número de muestras por tratamiento fue de 5. Los datos se expresan como unidades relativas de intensidad de color.

2.B.7. Análisis semicuantitativo del ARN mensajero de leptina, ObR, RI, PPARα, LPL, LE, ACO, CPT-1, MRP 2, 3 y 4, Nrf2, vWF y CTK

Para extraer el ARN de placentas e hígados, 100 mg de tejido guardado en solución RNAlater® a -80°C fue homogeneizados en reactivo Tri Reagent y extraído siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras atravesaron dos rondas de separación, luego el ARN fue precipitado y resuspendido en agua estéril libre de ARNasas. Sobre cada muestra se midió la concentración de mensajero por la determinación espectrofotométrica en NANODROP 1000.

El cDNA fue sintetizado incubando 4 µg de ARN extraído en un primer buffer conteniendo cebadores hexámeros al azar (Promega), la que fue colocada en un termociclador durante 5 minutos a 72 °C. Luego, se adicionaron la enzima M-MLV (transcriptasa reversa) (Promega), los dNTPs (Invitrogen) y el buffer comercial correspondiente a la enzima (Invitrogen). En esta segunda etapa, se utilizó una temperatura de 37 °C durante 60 minutos, seguida de 70 ºC por 15 minutos.

El cDNA (2 µl) fue amplificado por PCR en una mezcla de reacción conteniendo la Go Taq Green Mater Mix (Promega), la cual incluye dNTPs, cloruro de magnesio y el buffer correspondiente a la enzima. Además se adicionó el par de cebadores específico. Los cebadores fueron diseñados utilizando la página web pública Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3) y comprados en Invitrogen (**Tabla 5**). En el caso de los cebadores para la amplificación del receptor de insulina (RI), éstos fueron diseñados de manera de que el amplicón incluya al exón 11, por lo que las dos isoformas del receptor son amplificadas en la reacción. En la **Tabla 6** se especifica el número de ciclos utilizado para la amplificación de cada gen y en cada tejido. La selección del número de ciclo consistió en realizar una prueba en la cual se amplificó el gen de interés utilizando diferente números de ciclos, y se seleccionó el número de ciclo mediante el cual se obtuvo un valor de amplificación ubicado dentro del rango de amplificación lineal. Luego, se realizó una curva de concentración de cDNA con el ciclo seleccionado. De manera general, cada PCR se realizó programando el termociclador de la siguiente manera: una primera etapa de 2 minutos a 95 °C, seguida de la cantidad de ciclos requeridos para cada gen (**Tabla 6**). Cada ciclo consistió en: desnaturalización a 95ºC durante 15 s, apareamiento a 58ºC durante 30 s y extensión a 72 °C durante 15s. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% preparados en el buffer TAE con el agregado de SYBER Safe. En el caso del receptor de insulina se utilizó un gel de agarosa al 3% para poder resolver las isoformas del receptor. Los geles fueron revelados mediante luz UV en un equipo Image Quant y para la cuantificación de los mismos se utilizó el

programa Image J. La cantidad de mensajero de la proteína ribosomal L30 (RPL30) en la muestra se utilizó como control interno.

Cebador	**Sentido** (5´- 3´)	**Anti-Sentido** (5´- 3´)
IR	CGAGTGCTGCTCATGTCCTA	GTGGAGGAGATGTTGGGAAA
ObRa	GTTCCTGGGCACAAGGACTTAAT	ACTGTTGGGAGGTTGGTAGATTG
ObRb	GTTCCTGGGCACAAGGACTTAAT	GGTTCCCTGGGTGCTCTGA
Leptina	TTCACACACGCAGTCGGTAT	TGAGCTATCTGCAGCACGTT
PPARα	TCACACAATGCAATCCGTTT	GGCCTTGACCTTGTTCATGT
ACO	CCAATCACGCAATAGTTCTGG	CGCTGTATCGTATGGCGAT
CPT1	TATCGTCGCACATTAGACC	CATCTATGACCTCCTGGCA
Nrf2	AGTCGCTTCCCTGGATATTC	GCCGGAGTCAGAGTCATTGAA
MRP2	GAAGGCATTGACCCTATCT	CCACTGAGAATCTCATTCATG
MRP3	ACACCGAGCCAGCCATATAC	TCAGCTTCACATTGCCTGTCG
MRP4	ATCCTCATACCCCTGGTTCC	TGCATCAAACAGCTCCTGAC
LPL	CCCTAAGGACCCCTGAAGAC	GGCCCGATACAACCAGTCTA
EL	ACCAGAGTGGTGGGACGTAG	GGACAGCCTCCTGTTGATGT
vWF	ATTTCCAGTGAGGCCTTCGG	TCTGAGGTCAAGGTCCCCTC
CTK7	CAGGCAGAGATTGACACCGT	CAGACAACCTGCTCTCCTCG
RPL30	CCATCTTGGCGTCTGATCTT	TGGCGAGGATAACCAATTTC

Tabla 5: Secuencias de cebadores utilizados para PCR semi cuantitativa.

Cebador	Placenta	Placenta inyectada	Hígado fetal	Hígado fetal inyectado	Hígado fetal incubado	Higado crías 21 días	Higado crías 140 días
IR	35	35	36	37	-	-	-
ObRa	34	34	35	37	37	34	35
ObRb	35	35	real time	real time	real time	36	35
Leptina	30	-	38	-	-	-	-
PPARα	-	-	31	25	31	32	30
ACO	-	-	27	29	32	29	23
CPT1	-	-	35	35	33	35	35
Nrf2	-	-	33	-	-	23	29
MRP2	-	-	31	-	-	30	31
MRP3	-	-	30	-	-	27	33
MRP4	-	-	34	-	-	35	33
LPL	32	32	28	28	31	30	31
EL	30	30	-	-	-	-	-
vWF	31	31	-	-	-	-	-
CTK7	25	25	-	-	-	-	-
RPL30	24	24	23	22	24	25	24

Tabla 6: Número de ciclo óptimo para cada cebador en cada tejido.

2.B.8. Análisis en tiempo real del ARN mensajero de ObRb

Se llevó a cabo la extracción de ARN y síntesis de cDNA de los hígados fetales de igual manera que en la técnica de PCR semicuantitativa. Luego, una dilución de cDNA fue amplificada por PCR en tiempo real en un buffer conteniendo dNTPs, enzima GoTaq Polimerasa, el intercalante fluorescente Eva Green y el par de cebadores específico (**Tabla 7**). La cantidad de mensajero de la proteína ribosomal L30 (RPL30) en la muestra se utilizó como control interno. La dilución de cDNA utilizada fue seleccionada mediante la realización de una curva de concentración de cDNA, que consistió en la amplificación de diluciones en serie del cDNA de interés. Se corroboró que la eficiencia de amplificación de la curva fuera de 0,8-1,2 y se seleccionó la dilución que presentó el valor de amplificación deseado, dentro del rango lineal de amplificación. La concentración de cebadores y la temperatura de apareamiento y extensión se seleccionaron de manera que no se

observara amplifiación de cebadores. Para la amplificación del mensajero del gen ObRb se realizó un paso inicial a 95ºC durante 4 minutos y luego 40 ciclos que consistieron en: desnaturalización a 95ºC durante 10s, apareamiento a 64ºC durante 15s y extensión a 72 °C durante 20s. Para la amplificación del mensajero del gen L30 (utilizado como gen de referencia) los ciclos consistieron en: desnaturalización a 95ºC durante 10s, apareamiento a 60ºC durante 15s y extensión a 72 °C durante 20s. Los productos amplificados se cuantificaron por fluorescencia en un termociclador de tiempo real Rotor Gene 6000 Corbette. El análisis de los resultados se observó en el programa Rotor Gene Q. El análisis de resultados se llevó a cabo mediante el método del 2 delta-delta Ct *(Livak y Schmittgen 2001).*

Cebador	**Sentido** (5´- 3´)	**Anti-Sentido** (5´- 3´)
ObRb	CTGTGGTTTGCGTATGGAAGT	CTCTTGCTCCTCACCTGGAC
RPL30	CCATCTTGGCGTCTGATCTT	TGGCGAGGATAACCAATTTC

Tabla 7: Secuencias de cebadores utilizados para PCR en tiempo real (qPCR).

2.B.9. Ensayos metabólicos

-*Medición de glucemia*: los valores de glucemias de las ratas gestantes, los fetos y las crías de 12 y 140 días de edad fueron medidos a través de tiras reactivas Accu-Chek y un glucómetro (Accu-Chek; Bayer Diagnostics) a partir de sangre obtenida de la vena de la cola.

-*Medición de triglicéridos y colesterolemia plasmáticos*: los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol en plasma materno, fetal y de crías de 12 y 140 días de edad fueron medidos mediante un equipo comercial enzimático colorimétrico (Wiener Lab., Rosario, Argentina).

-*Medición de la insulina plasmática*: los niveles de insulina en plasma materno, fetal y de crías de 140 días de edad se midieron utlizando un EIA comercial (insulina Mercodia Ultrasensible Rata kit ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se permitió que las muestras y los calibradores interactuaran con un anticuerpo anti-insulina adherido sobre una microplaca y con la enzima conjugada. Luego de 2 horas de incubación el inespecífio fue lavado y el sustrato de la enzima añadido. Después de 15 minutos se detuvo la reacción y la placa se leyó a 450 nm. La concentración de insulina en las muestras se obtuvo utilizando una curva de calibración.

-*Medición de la leptina*: los niveles de leptina en plasma materno y fetal se midieron utilizando un EIA comercial (leptina de rata TiterZyme® EIA, Ensayo Designs) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se permitió que las muestras de plasma o los estándares interactuaran

durante 1 h a 37ºC con el anticuerpo anti-leptina (hecho en conejo) adherido sobre una microplaca. Después de lavar suavemente se añadió un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, se dejó interactuar durante 30 minutos a 37 °C y se realizó un lavado. Se añadió el sustrato y luego de 30 minutos se detuvo la reacción y la placa se leyó a 450 nm. La concentración de leptina en las muestras se obtuvo utilizando una curva de los estándares.

-*Cálculo del índice HOMA*: el valor del índice HOMA se calculó a partir de los valores de insulinemia y glucemia en ayunas como HOMA= Insulina (UI/ml) x glucosa (mg/dl)/405 *(Asano y col. 2007)*.

-*Curva de tolerancia a la glucosa*: ratas gestantes del grupo control y del grupo DGS fueron inyectadas con glucosa (30 mg/Kg rata, intraperitoneal), luego se registró los el valor de glucemia a diferentes tiempos.

-*Curva de sensibilidad a la insulina*: ratas gestantes del grupo control y del grupo DGS fueron inyectadas con insulina (0,1U/Kg rata, subcutáneo), luego se registró los el valor de glucemia a diferentes tiempos.

2.B.10. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media ± error estándar. Se comprobó la normalidad de los datos antes de realizar el análisis estadístico mediante el test de Shapiro-Wilk (software Statistix 10). Los grupos se compararon mediante el test t-Student o ANOVA de dos factores y post test de Bonferroni (software Prism 5). En todos los casos, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P<0,05$.

RESULTADOS

Capítulo 1: Efectos del exceso moderado de grasas saturadas en la dieta materna: caracterización del modelo dietario.

1.1. Composición nutricional de los tratamientos dietarios.

Con el objetivo de generar un modelo de sobrepeso en la rata que nos permitiera abordar la problemática del sobrepeso adquirido previamente y durante la gestación, se llevó a cabo un tratamiento dietario diferencial en ratas hembra Wistar.

Las ratas que formaron el grupo control (CT) recibieron alimento estándar comercial, mientras que las ratas pertenecientes al grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) recibieron el mismo alimento comercial suplementado con un 25% de grasas saturadas de origen animal. En la **Tabla 8** se muestra la composición nutricional de ambas dietas y en la **Tabla 9** el porcentaje de calorías aportadas por cada componente dietario.

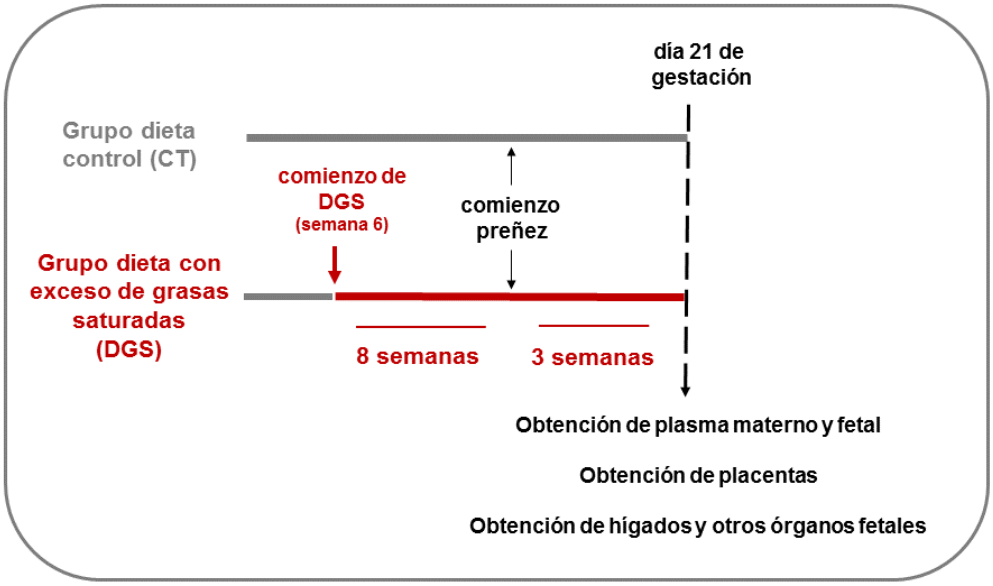
	Dieta Control (CT)	**Dieta Grasas Saturadas (DGS)**
Proteínas (g)	22	21
Carbohidratos (g)	47	41
Grasas (g)	5	27
Energía (Kcal)	352	522

Tabla 8: Composición nutricional de los tratamientos dietarios cada 100 g de alimento.

	Dieta Control (CT)	**Dieta Grasas Saturadas (DGS)**
Proteínas (% Kcal)	28,1	18,1
Carbohidratos (% Kcal)	60,1	35,3
Grasas (% Kcal)	12,8	46,5
Energía (Kcal/100g)	352	522

Tabla 9: Porcentaje de calorías sobre el total de calorías.

La dieta comenzó a suministrarse a las seis semanas de edad y continuó durante ocho semanas, momento en el cual las ratas fueron puestas en apareo con machos controles. El tratamiento dietario se extendió a lo largo de la gestación hasta el día 21 de la misma (día previo al parto). En este día se realizó la eutanasia de los animales y se obtuvieron las muestras biológicas necesarias para los ensayos (**Esquema 16**).



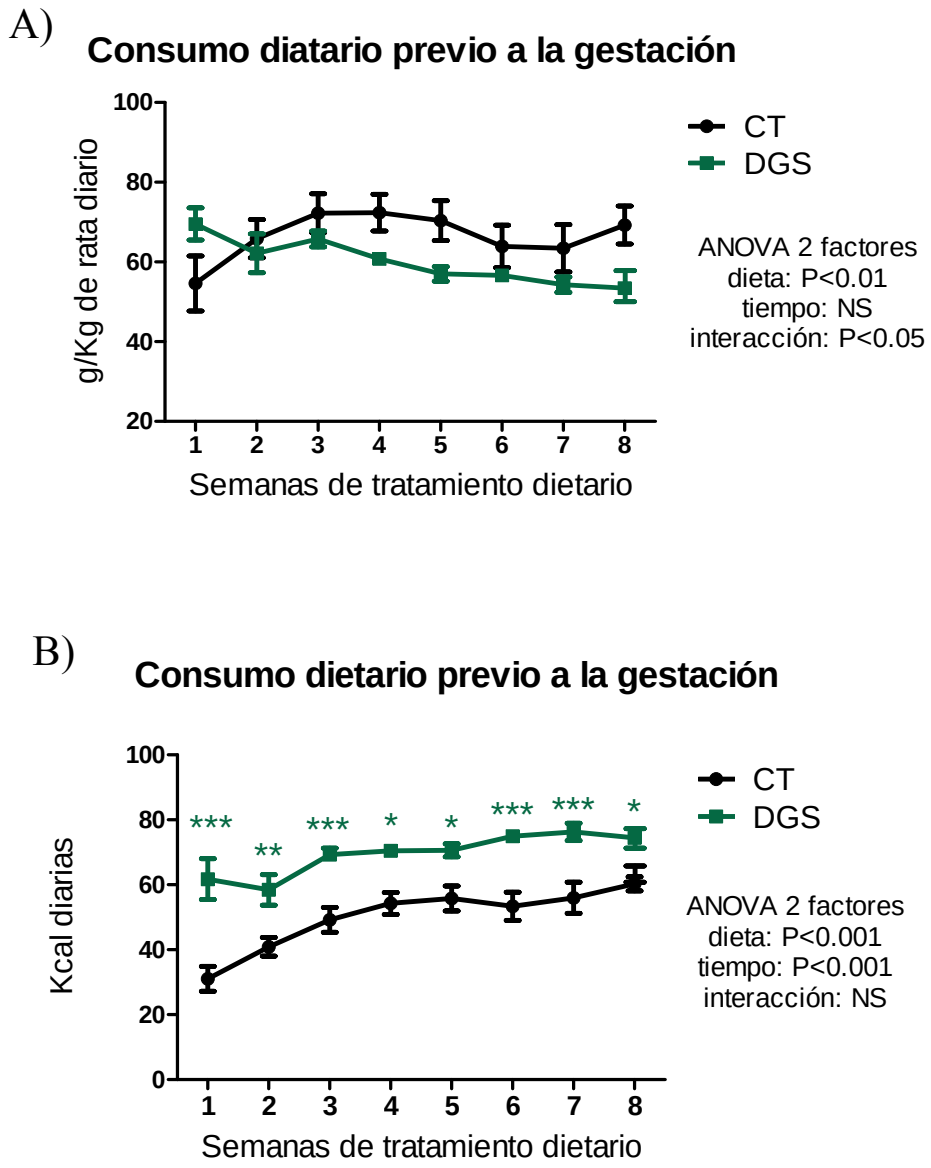
Esquema 16: Modelo experimental para la obtención de plasma materno y fetal, placentas e hígados y órganos fetales provenientes del grupo de ratas control (CT) y del grupo de ratas alimentado con exceso de grasas saturadas (DGS).

1.2. Consumo dietario previo y durante la gestación.

Se registró el consumo dietario diario del grupo de ratas alimentado con dieta control (CT) y con dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) a partir del inicio del tratamiento dietario (semana seis de vida), durante ocho semanas previas a la gestación y a lo largo de los 21 días de gestación.

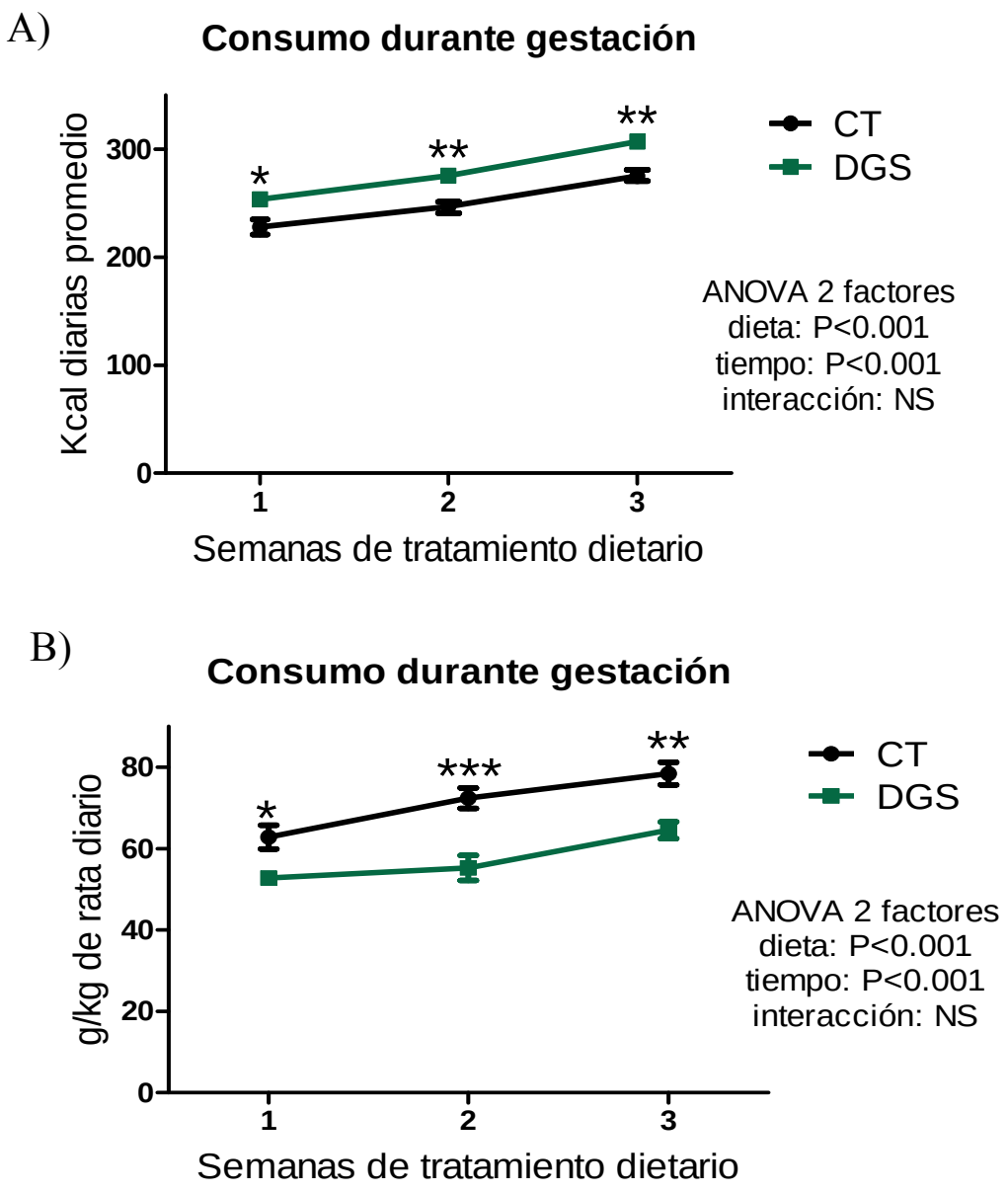
En el período previo a la gestación registramos un menor consumo de alimento en el grupo DGS (gramos de alimento por kilogramo de rata) respecto del grupo CT, sin embargo, este menor consumo en gramos de alimento aportó una mayor cantidad de kilocalorías promedio diarias (**Figura 1**). Durante la preñez observamos un patrón similar en el consumo de alimento. En las ratas del grupo DGS el consumo en gramos por peso de rata fue menor respecto del grupo CT pero estos valores se correspondieron con una mayor ingesta de kilocalorías diarias promedio (**Figura 2**).

Figura 1: Consumo dietario previo a la gestación.



Consumo dietario diario previo a la gestación en ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) expresado en A) gramos de alimento/kilogramo de rata y en B) kilocalorías (Kcal) diarias promedio. Diferencia estadística entre CT y DGS: * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001. n=12. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Figura 2: Consumo dietario diario durante la gestación.



Consumo dietario diario durante la gestación en ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) expresado en A) gramos de alimento/kilogramo de rata y en B) kilocalorías (Kcal) diarias promedio. Diferencia estadística entre CT y DGS: *P<0,05, ** P<0,01. n=12. Test estadístico Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

1.3. Efecto del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre el peso materno, fetal, placentario, de órganos fetales y sobre el número de fetos por camada.

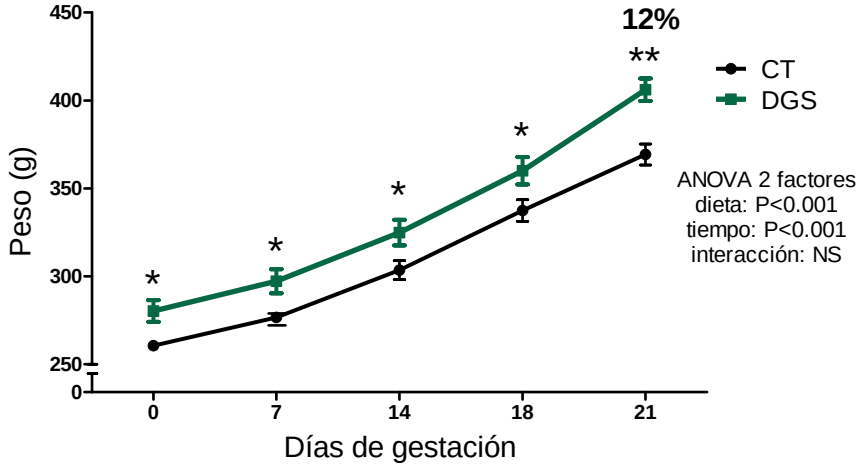
- **Peso materno previo y durante la gestación**

Se registró el peso corporal del grupo de ratas alimentado con dieta control (CT) y con dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) a partir del inicio del tratamiento dietario (semana seis de vida), previo a la gestación y durante la gestación.

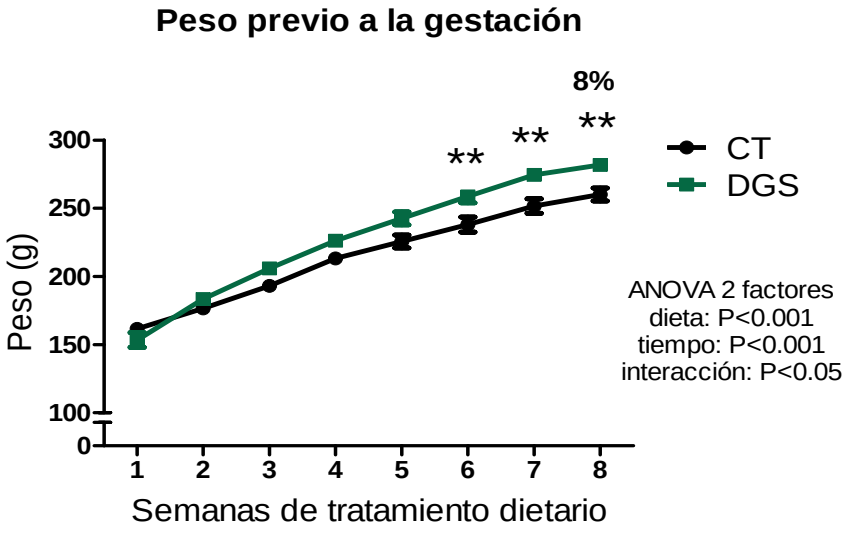
En las últimas semanas de dieta administrada previamente a la gestación las ratas del grupo DGS presentaron mayor peso corporal respecto a las controles. Luego de las 8 semanas de dieta las ratas del grupo DGS presentaban un 8% de aumento en el peso corporal respecto de las controles (**Figura 3A**). Esta diferencia se mantuvo a lo largo de los 21 días de gestación acentuándose en el último día de este período, momento en el cual las ratas del grupo DGS presentaron un 12% de aumento en el peso corporal respecto de las controles (**Figura 3B**).

Figura 3: Peso materno previo y durante la gestación.

A)



B)



Peso materno A) previo y B) durante la gestación en ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). Diferencia estadística entre CT y DGS: * P<0,05, ** P<0,01. n=12. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

.

- **Peso placentario, fetal, de órganos fetales y número promedio de fetos por camada**

Con el objetivo de realizar un análisis del crecimiento feto-placentario se realizó la eutanasia de las ratas en el día 21 de gestación. Se explantaron y se pesaron las placentas, los fetos y los órganos fetales. En el grupo de ratas alimentado con la dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) se observó un mayor peso fetal y placentario respecto del grupo control (P<0,01, **Tabla 10**).

El incremento de peso fetal total fue acompañado por un incremento en el peso de algunos órganos fetales como el páncreas, el intestino y el estómago (P<0,01, **Tabla 11**). El número de fetos por camada fue mayor en grupo DGS respecto del CT (P<0,05, **Tabla 10**). No se encontraron diferencias en cuanto al número de fetos hembra y macho como tampoco se vieron diferencias género-dependientes en relación al peso de la placenta y los órganos fetales (**Tablas 10 y 11**).

La eficiencia placentaria, definida como el cociente entre el peso fetal y el peso placentario, representa un índice de la capacidad de la placenta de proveer sustento para el crecimiento fetal *(Hayward y col. 2016)*. No encontramos diferencias en la eficiencia placentaria en el día 21 de gestación en el grupo DGS respecto del CT (**Tabla 10**).

		Control	DGS	
Peso placentario (mg)	Hembra	531.8 ± 9.2	590.7 ± 8.1 ***	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,001 Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	536.6 ± 9.6	592.6 ± 9.2 ***	
Peso fetal (g)	Hembra	3.36 ± 0.10	3.90 ± 0.14 **	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,001 Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	3.20 ± 0.09	3.70 ± 0.10 **	
Eficiencia placentaria	Hembra	6,32 ± 0,7	6,62 ± 0,95	ANOVA 2x2 Dieta: NS Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	5,96 ± 0,64	6,24 ± 0,92	
Número de fetos	Hembra	6.0 ± 0.5	8.0 ± 0.7 *	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,01 Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	5.0 ± 0.6	7.0 ± 0.6 *	

Tabla 10: Peso placentario, peso fetal, eficiencia placentaria y número promedio de fetos por camada en el grupo de ratas control (CT) y el grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). Diferencia estadística entre CT y DGS: * P<0.05, ** P<0,01, *** P<0,001. n=12. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

		Control	DGS	
Peso hígado fetal (mg)	Hembra	307 ± 11	308 ± 12	ANOVA 2x2 Dieta: NS Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	311 ± 8	319 ± 14	
Peso páncreas fetal (mg)	Hembra	21.4 ± 1.1	26.93 ± 0.8 **	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,001 Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	21.98± 1.4	27.90 ± 1.2 **	
Peso intestino fetal (mg)	Hembra	93 ± 2.01	102.3 ± 2.40 **	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,001 Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	91 ± 2.22	100.2 ± 2.06 **	
Peso estómago fetal (mg)	Hembra	16 ± 0.9	21.1 ± 1.2 **	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,001 Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	17 ± 0.7	22.3 ± 1,0 **	
Peso pulmones fetales (mg)	Hembra	97.1 ± 1.8	101.0 ± 2.2	ANOVA 2x2 Dieta: NS Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	98.1 ± 1.3	102.3 ± 3.1	
Peso corazón fetal (mg)	Hembra	22.5 ± 1.2	22.9 ± 1.3	ANOVA 2x2 Dieta: NS Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	23.9 ± 1.6	24.2 ± 0.9	

Tabla 11: Peso de órganos fetales en el grupo de ratas control (CT) y el grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). Diferencia estadística entre CT y DGS: ** P<0,01. n=12. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

1.4. Efecto del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la glucemia, trigliceridemia y colesterolemia materna y fetal.

Se analizaron algunos parámetros plasmáticos en el modelo en estudio. Se dosaron los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en el plasma materno y fetal. Encontramos un incremento en la trigliceridemia materna y fetal en el grupo DGS respecto del grupo control (**Tablas 12 y 13**). No evidenciamos cambios en los niveles de glucemia y colesterolemia de las madres del grupo DGS respecto del control (**Tabla 12**), sin embargo, encontramos mayores niveles de glucemia

en fetos hembra y macho del grupo DGS y de colesterol en fetos macho del grupo DGS al realizar la comparación con los fetos del grupo CT (**Tabla 13**).

.

	Control	DGS
Glucemia Materna (mg/dL)	82.1 ± 2.9	85.9 ± 2.1
Trigliceridemia Materna (g/L)	2.15 ± 0.31	4.04 ± 0.56 **
Colesterolemia Materna (g/L)	1.16 ± 0.07	1.17 ± 0.09

Tabla 12: Niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos y colesterol en madres del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) en el día 21 de gestación. Diferencia estadística entre grupo CT y DGS: ** P<0,01. n=12. Test estadístico: t-Student.

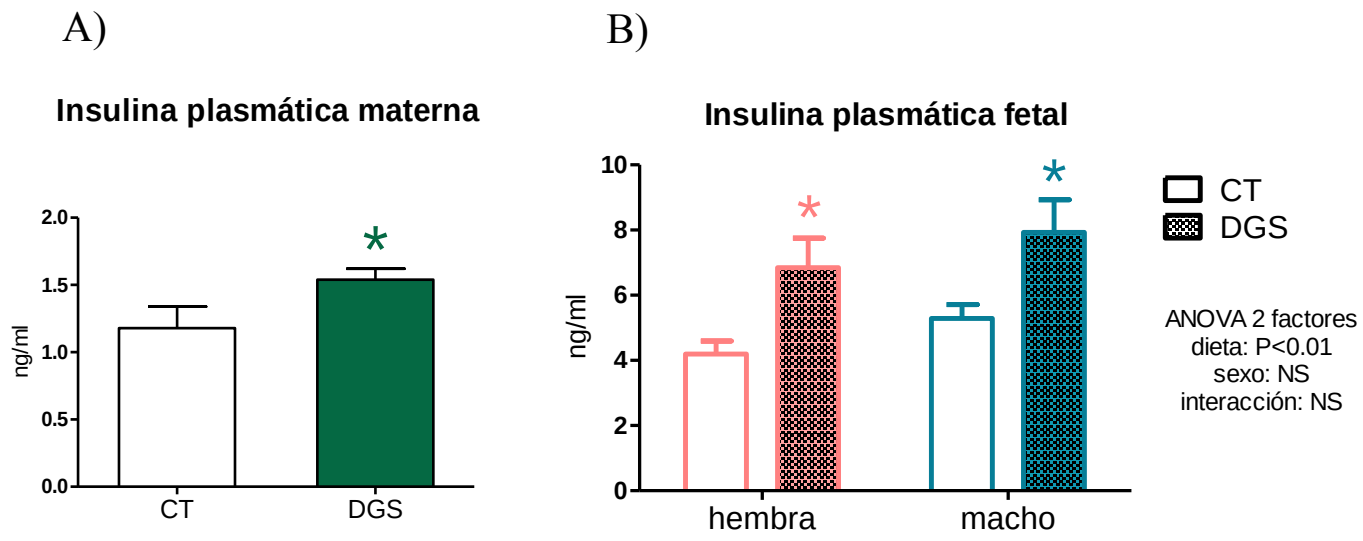
		Control	DGS	
Glucemia Fetal (mg/dL)	Hembra	45.59 ± 4.40	64.57 ± 6.40 *	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,001 Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	42.80 ± 3.10	58.20 ± 4.05 *	
Trigliceridemia Fetal (g/L)	Hembra	0.52 ± 0.07	0.92 ± 0.08 **	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,001 Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	0.50 ± 0.08	0.9 ± 0.07 **	
Colesterolemia Fetal (g/L)	Hembra	0.60 ± 0.05	0.80 ± 0.06 *	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,01 Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	0.65 ± 0.06	0.85 ± 0.07 *	

Tabla 13: Niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos y colesterol en fetos del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) en el día 21 de gestación. Diferencia estadística entre grupo CT y DGS: *P<0.05, **P<0.01. n=12. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

1.5. Efecto del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la insulinemia y leptinemia materna y fetal.

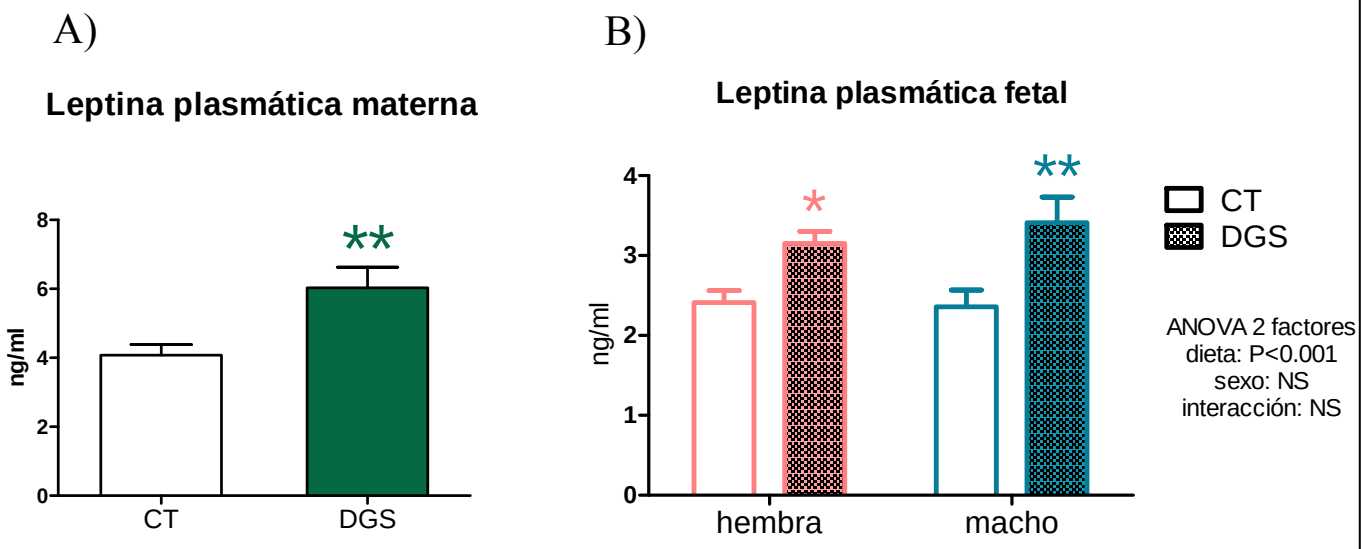
Conociendo la relevancia de insulina y leptina en la regulación del metabolismo lipídico, y sabiendo que sus alteraciones se encuentran ampliamente asociadas a disfunciones metabólicas como dislipemias, obesidad y diabetes *(Mantzoros y col. 2011, Guo 2014)*, evaluamos los niveles de insulina y leptina en el plasma materno y fetal. Encontramos niveles incrementados de insulina y leptina en el plasma de madres y fetos de ambos sexos del grupo DGS respecto del grupo control (Figuras 4 y 5).

Figura 4: Niveles plasmáticos de insulina en madres y fetos del grupo CT y DGS en el día 21 de gestación.



Niveles plasmáticos de insulina en A) madres y B) fetos del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) en el día 21 de gestación. Diferencia estadística entre grupo CT y DGS: * P<0.05. n=6. Test estadístico A) t-Student, B) Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Figura 5: Niveles plasmáticos de leptina en madres y fetos del grupo CT y DGS en el día 21 de gestación.

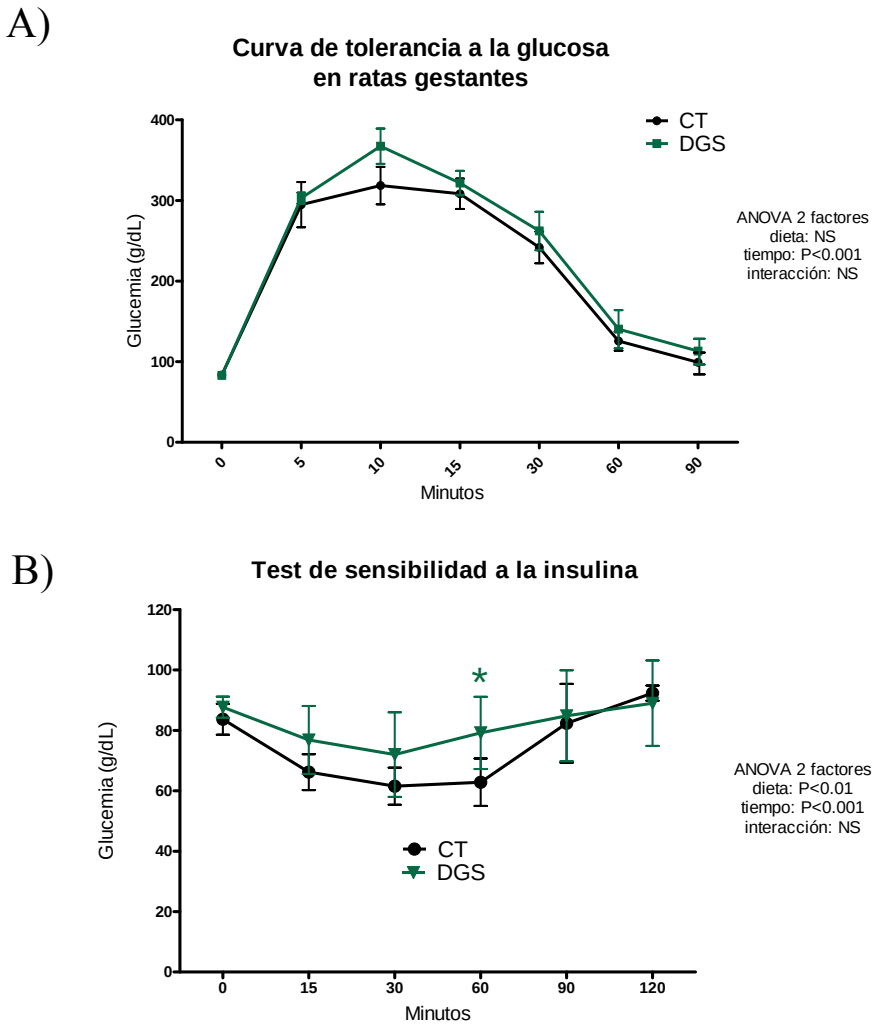


Niveles plasmáticos de leptina en A) madres y B) fetos del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) en el día 21 de gestación. Diferencia estadística entre grupo CT y DGS: *P<0,05, ** P<0,01. n=6. Test estadístico A) t-Student, B) Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

1.6. Efecto del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa.

Los altos niveles de insulina observados en el plasma materno de ratas gestantes del grupo DGS (en ausencia del concomitante descenso de la glucemia) nos condujeron a evaluar la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina en estos animales. Para ello, las ratas gestantes de ambos grupos dietarios fueron sometidas a una prueba de tolerancia a la glucosa y a una prueba de sensibilidad a la insulina en el día 21 de gestación. En la primera prueba no observamos diferencias entre los grupos dietarios estudiados (**Figura 6A**). En la segunda prueba encontramos una menor sensibilidad a la insulina en las ratas DGS, evidenciada por una menor capacidad de disminuir la glucemia 60 minutos después de la inyección de insulina (**Figura 6B**).

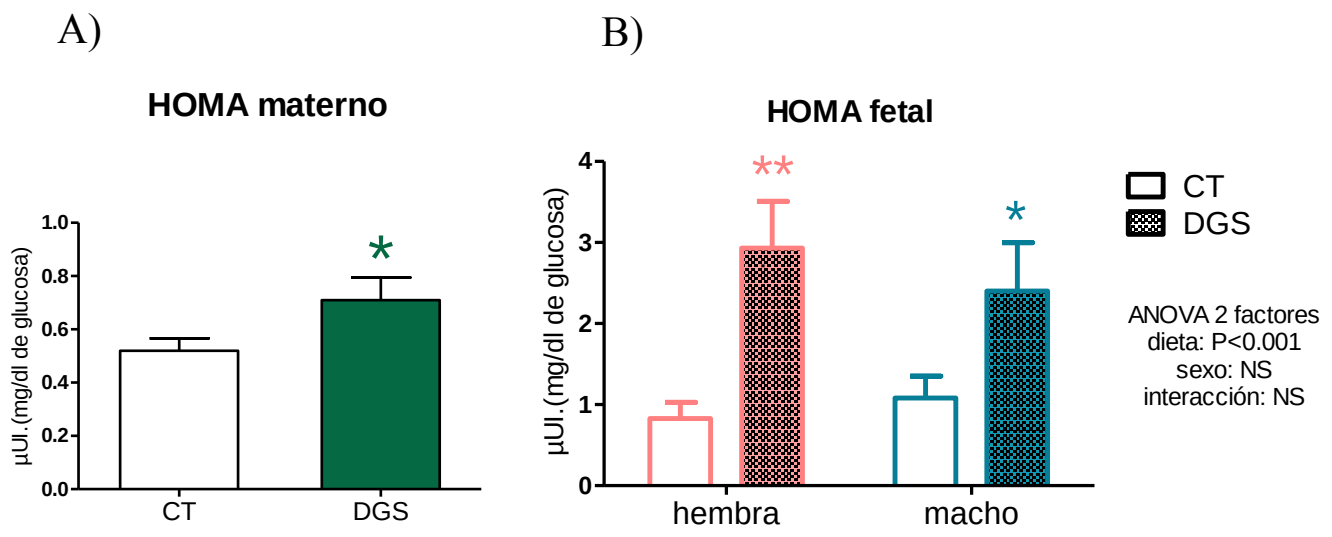
Figura 6: Curva de tolerancia a la glucosa y de sensibilidad a la insulina en ratas del grupo CT y DGS en el día 21 de gestación.



Curva de A) tolerancia a la glucosa (30 mg/Kg rata, i.p) y de B) sensibilidad a la insulina (0,1U/Kg rata, s.c) en ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) en el día 21 de gestación. Diferencia estadística entre grupo CT y DGS: * P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

La evaluación del modelo homeostático o índice HOMA nos permitió realizar estimaciones de resistencia insulínica utilizando los valores plasmáticos de glucosa e insulina en ayunas. El HOMA tanto materno como de fetos hembra y machos del grupo DGS presentó un valor mayor respecto del HOMA del grupo control, indicando resistencia a la insulina en este grupo, sin observarse diferencias género-dependientes en los fetos (**Figura 7**).

Figura 7: Índice HOMA en ratas y fetos del grupo CT y DGS en el día 21 de gestación.



Índice HOMA en A) madres y B) fetos del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) en el día 21 de gestación. Diferencia estadística entre grupo CT y DGS: *P<0,05, **P<0,01. n=6. Test estadístico: A) t-Student, B) Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Resumen del Capítulo 1

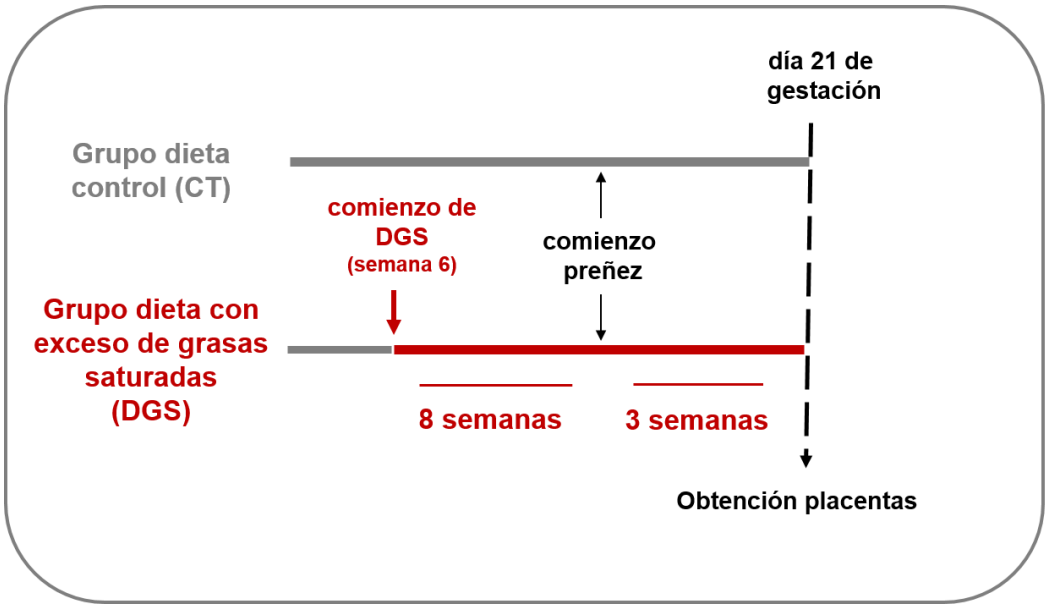
El exceso de grasas saturadas en la dieta materna induce alteraciones en parámetros morfométricos y plasmáticos tanto en las ratas gestantes como en sus fetos. El exceso de ingesta calórica proveniente de grasas saturadas induce un aumento en el peso materno, fetal y placentario. A nivel plasmático la dieta grasa produce incrementos en la trigliceridemia, insulinemia y leptinemia materna y fetal. El índice HOMA, indicador de resistencia a la insulia se encontró levemente incrementado en madres del grupo DGS respecto del grupo CT. Este aumento se acentuó al comparar los fetos del grupo DGS respecto del grupo CT, indicando resistencia a la insulina en los fetos provenientes de madres que recibieron la dieta con exceso de grasas saturadas.

De esta manera, se estableció el modelo de sobreingesta materna de grasas saturadas como herramienta válida para el estudio de alteraciones metabólicas inducidas durante la gestación y asociadas al sobrepeso.

Capítulo 2: Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna y de inyecciones intra-fetales de leptina sobre la placenta

Parte A: Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la placenta.

La placenta es el órgano de intercambio materno-fetal. El tejido placentario se encuentra especializado para proveer al feto de nutrientes y oxígeno necesarios para su crecimiento y desarrollo *(Diaz y col. 2014)*. A fin de estudiar el impacto del exceso de grasas saturadas en la dieta materna a nivel placetario, se utilizaron las placentas provenientes de fetos de 21 días de gestación de ratas alimentadas con dieta control (CT) o con dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) (**Esquema 17**).

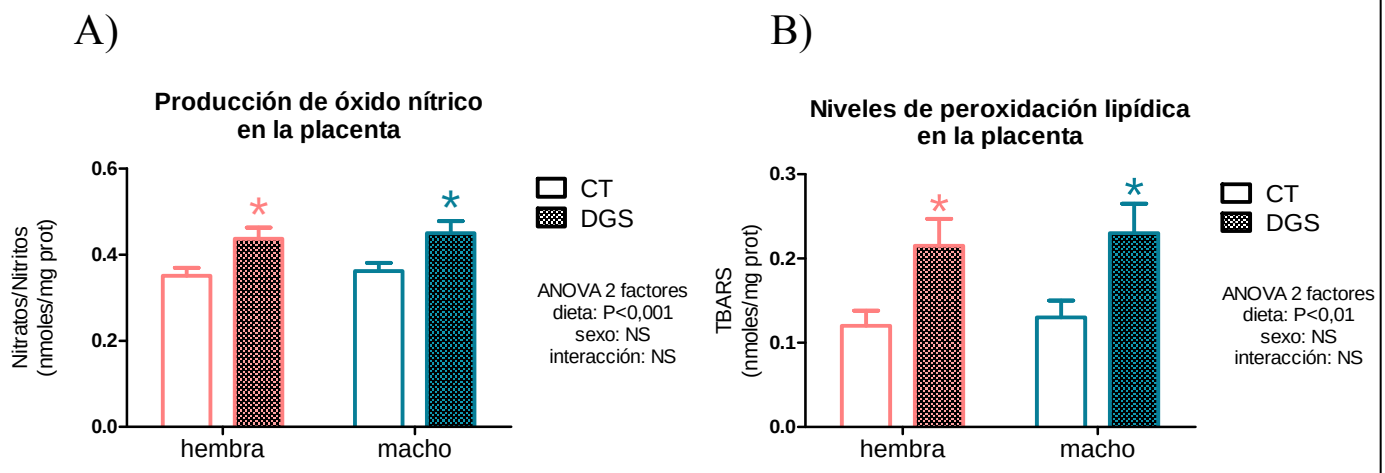


Esquema 17: Modelo experimental para la obtención de placentas provenientes de fetos de ratas del grupo control (CT) y de ratas alimentadas con exceso de grasas saturadas (DGS).

2.A.1. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la producción de óxido nítrico y niveles de peroxidación lipídica placentaria.

Analizamos algunos parámetros asociados al daño inducido por estrés oxidativo. Encontramos que las placentas (tanto de fetos hembra como macho) provenientes del grupo de ratas que recibieron la dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) presentaron una mayor producción de óxido nítrico y elevados niveles de peroxidación lipídica, respecto de las controles (**Figura 8**).

Figura 8: Niveles de producción de óxido nítrico y de peroxidación lipídica en placentas a término de ratas del grupo CT y DGS.



Niveles de producción de óxido nítrico (medición de nitratos/nitritos por ensayo de Griess) y niveles de peroxidación lipídica (ensayo de TBARS) en placentas a término de ratas del grupo CT y DGS. n=6. *P<0,05. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

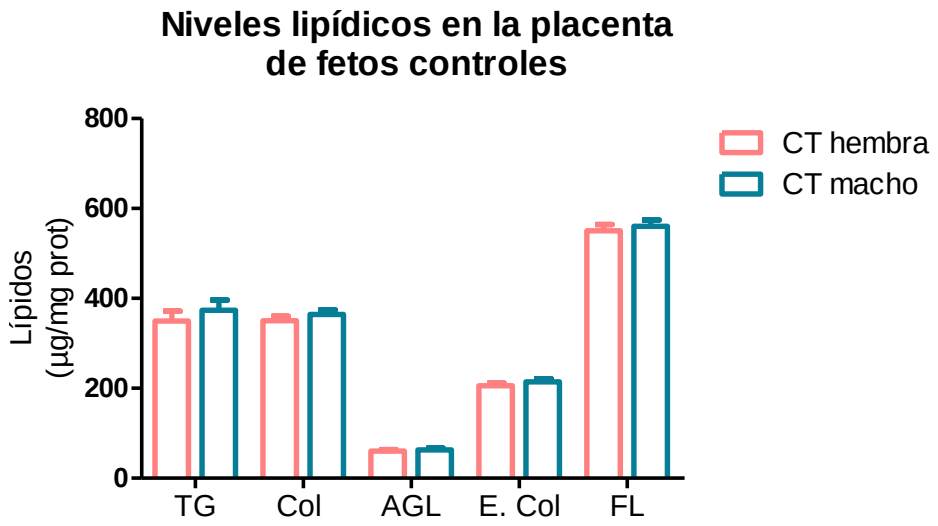
2.A.2. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de lípidos placentarios.

Los incrementados niveles de triglicéridos encontrados en el plasma materno y fetal del grupo DGS, sumado a las alteraciones en los valores circulantes de insulina y leptina, hormonas involucradas en el metabolismo lipídico, nos condujo a estudiar los niveles de lípidos tisulares en la placenta. No observamos diferencias género dependientes respecto a los niveles de lípidos en las placentas del grupo control (**Figura 9A**). Detectamos menores niveles de ácidos grasos libres (AGL) y ésteres de colesterol (Est. Col) en las placentas provenientes de ratas del grupo DGS respecto de

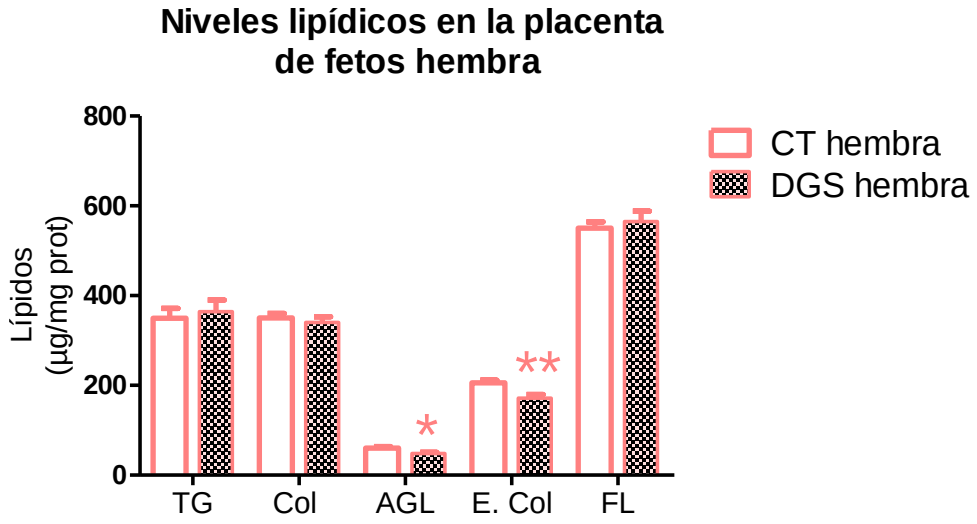
las placentas del grupo control. Este patrón se observó tanto en las placentas de fetos hembra como macho (P<0,05, **Figura 9 B y C**).

Figura 9: Niveles de lípidos en placentas a término de ratas del grupo CT y DGS.

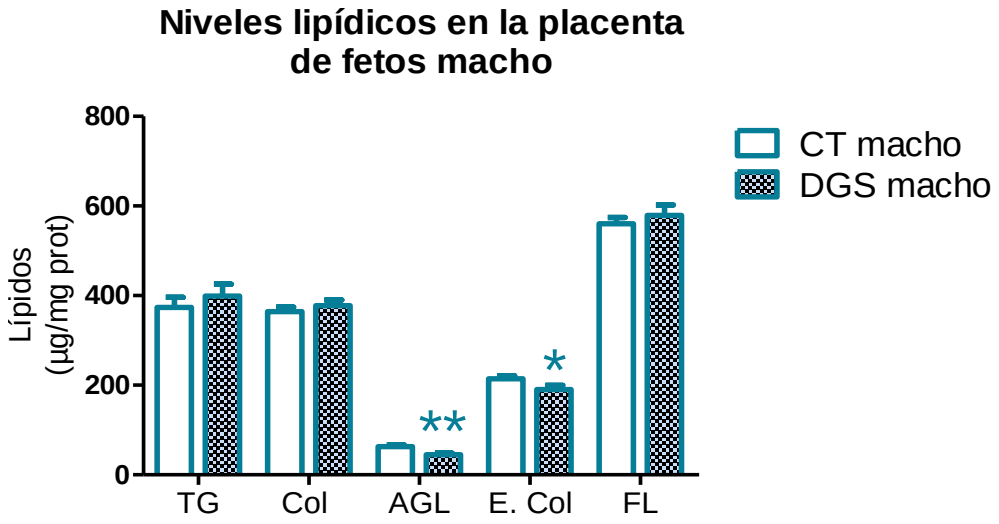
A)



B)



C)

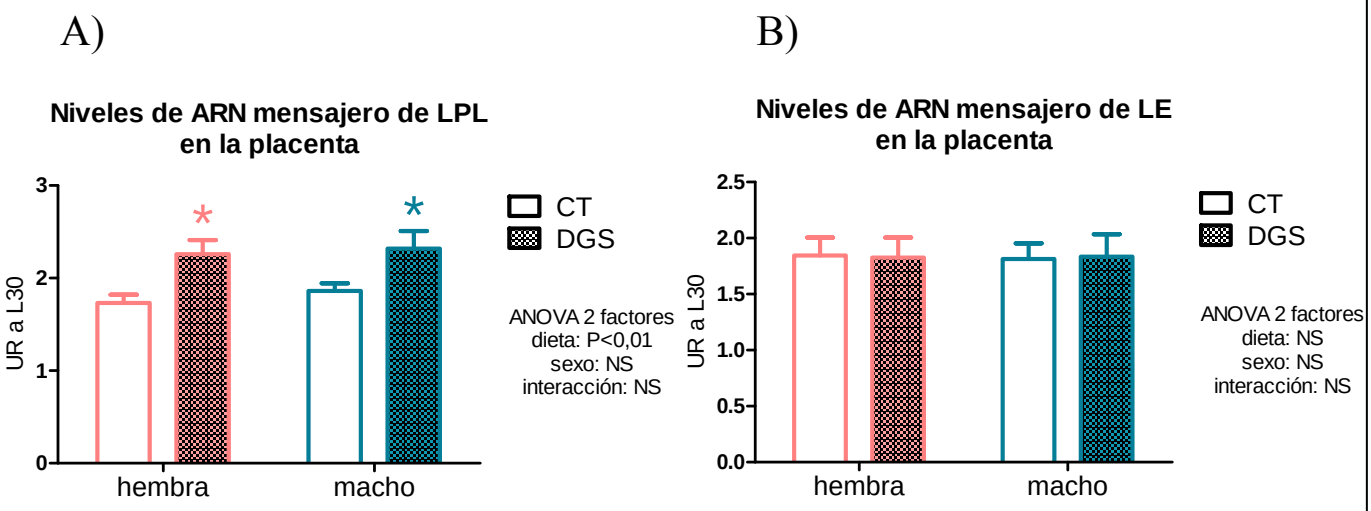


Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en placentas a término de fetos A) hembra y macho provenientes de ratas del grupo CT, B) hembra y C) macho provenientes de ratas del grupo CT y DGS. *P<0,05, ** P<0,01. n=6. Test estadístico: t-Student. TG: triglicéridos, Col: colesterol, AGL: ácidos grasos libres, E. Col: ésteres de colesterol, FL: fosfolípidos.

2.A.3. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de ARN mensajero de lipasas placentarias.

Analizamos los niveles de ARN mensajero de dos lipasas: la lipoproteína lipasa (LPL) y la lipasa endotelial (LE). Estas enzimas hidrolizan lípidos complejos contenidos en lipoproteínas a ácidos grasos que son luego captados por el trofoblasto y almacenados o transferidos al feto *(Brett y col. 2014)*. Encontramos mayores niveles de ARN mensajero de LPL en las placentas del grupo DGS respecto de las controles (P<0,05), mientras que no evidenciamos diferencias respecto a los niveles de ARN mensajero de LE entre los grupos dietarios (**Figura 10**). Los niveles de ARN mensajero de LPL y LE fueron similares en la placenta de fetos hembra y macho (**Figura 10**).

Figura 10: Niveles de ARN mensajero de LPL y LE en placentas a término de ratas del grupo CT y DGS.



Niveles de ARNm (PCR) de lipoproteína lipasa (LPL) y lipasa endotelial (LE) en placentas a término de fetos hembra y macho de ratas del grupo CT y DGS. *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

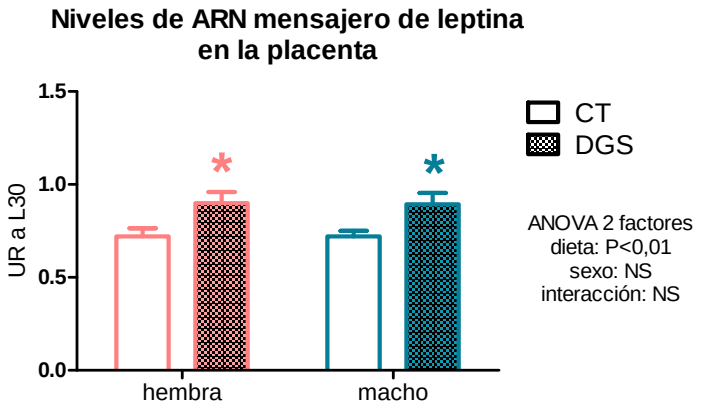
2.A.4. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de ARN mensajero de leptina y receptores de leptina placentarios.

Los altos niveles de leptina en el plasma materno y fetal observados en el grupo DGS nos condujeron a estudiar los niveles de ARN mensajero de leptina y sus receptores para conocer la producción local de la hormona y su potencial accionar.

- **Niveles de ARN mensajero de leptina placentaria**

Encontramos mayores niveles de ARN mensajero de leptina en las placentas del grupo DGS respecto de las del grupo CT (P<0,05), sin observarse diferencias género-dependientes (**Figura 11**).

Figura 11: Niveles de ARN mensajero de leptina en placentas a término de ratas del grupo CT y DGS.



Niveles de ARNm (PCR) de leptina en placentas a término de fetos hembra y macho de ratas del grupo CT y DGS. *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

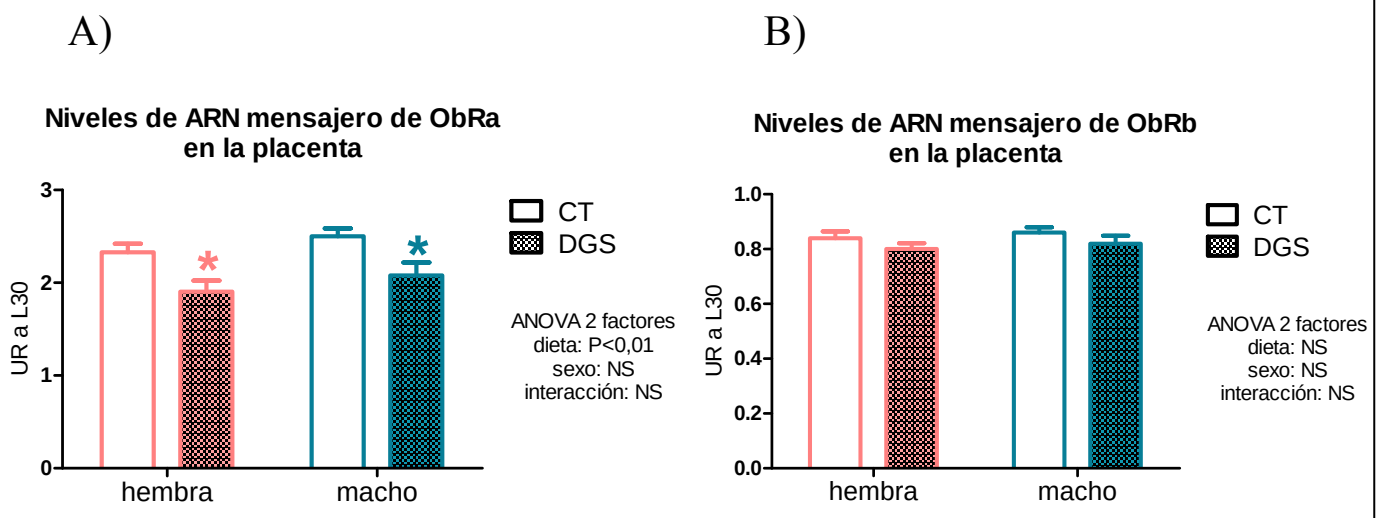
- **Niveles de ARN mensajero y de proteína del receptor de leptina placentario**

Existen varias isoformas de ObR generadas como producto de splicing alternativo del ARN o procesos proteolíticos. Las isoformas se clasifican en soluble (ObRe), cortas (ObRa, ObRc, ObRd y ObRf) y larga (ObRb). Evaluamos los niveles de ARN mensajero y de proteína de la isoforma corta (ObRa) y la isoforma larga (ObRb) del receptor de leptina.

Detectamos menores niveles de ARN mensajero de ObRa en las placentas del grupo DGS respecto de las controles (P<0,05, **Figura 12A**), mientras que no observamos diferencias en cuanto a ObRb entre los grupos dietarios estudiados (**Figura 12B**). No se observaron diferencias género-dependientes en ninguna de las isoformas analizadas (**Figura 12**). Para poder detectar los niveles de ARN mensajero de ObRb realizamos un protocolo de amplificación mediante PCR que constó de 5 ciclos más respecto al utilizado para el análisis de ObRa (ObRa: 30 ciclos, ObRb: 35 ciclos), lo que sugiere que la expresión génica de ObRb es menor que la de ObRa en la placenta.

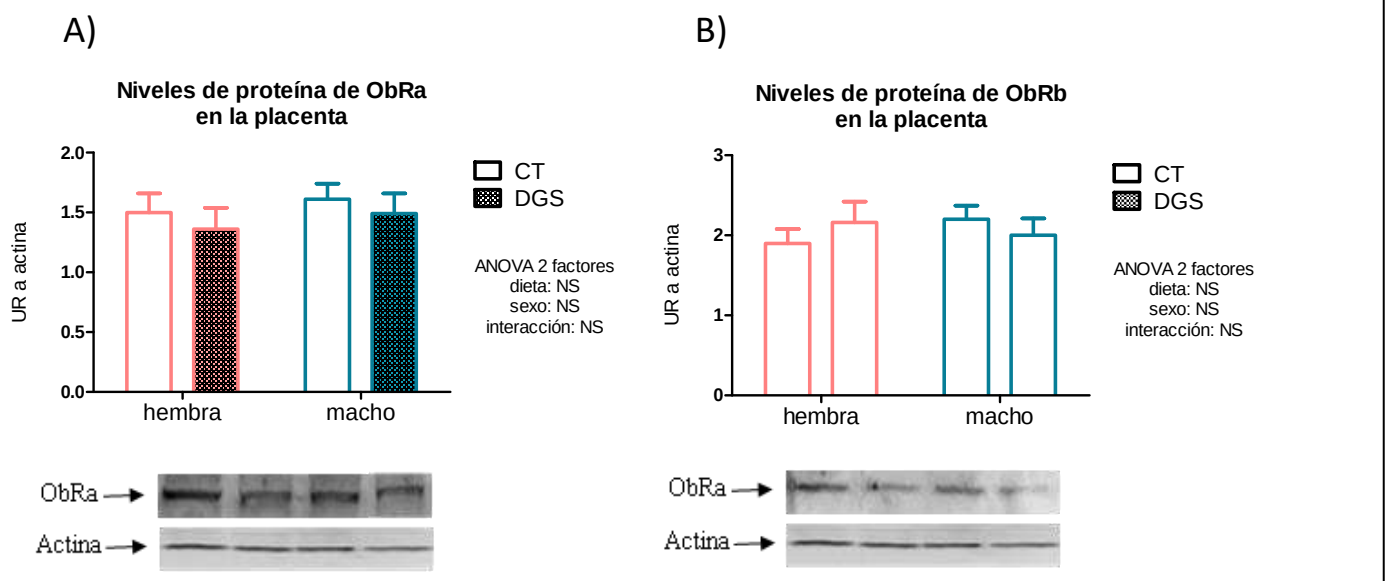
En cuanto a la expresión y localización proteica, no encontramos cambios en los niveles proteicos del receptor de leptina (ObR) en las placentas del grupo DGS respecto del grupo control (**Figura 13**). A través de la inmunohistoquímica localizamos a ObR en las tres zonas de la placenta, sin observar variaciones en su expresión relativa entre zonas debido a la dieta hipergrasa materna (**Figura 14**). La expresión proteica de ObR no presentó diferencias género-dependientes (**Figura 13 y 14**).

Figura 12: Niveles de ARN mensajero de la isoforma corta (ObRa) y la isoforma larga (ObRb) del receptor de leptina en placentas a término de ratas del grupo CT y DGS.



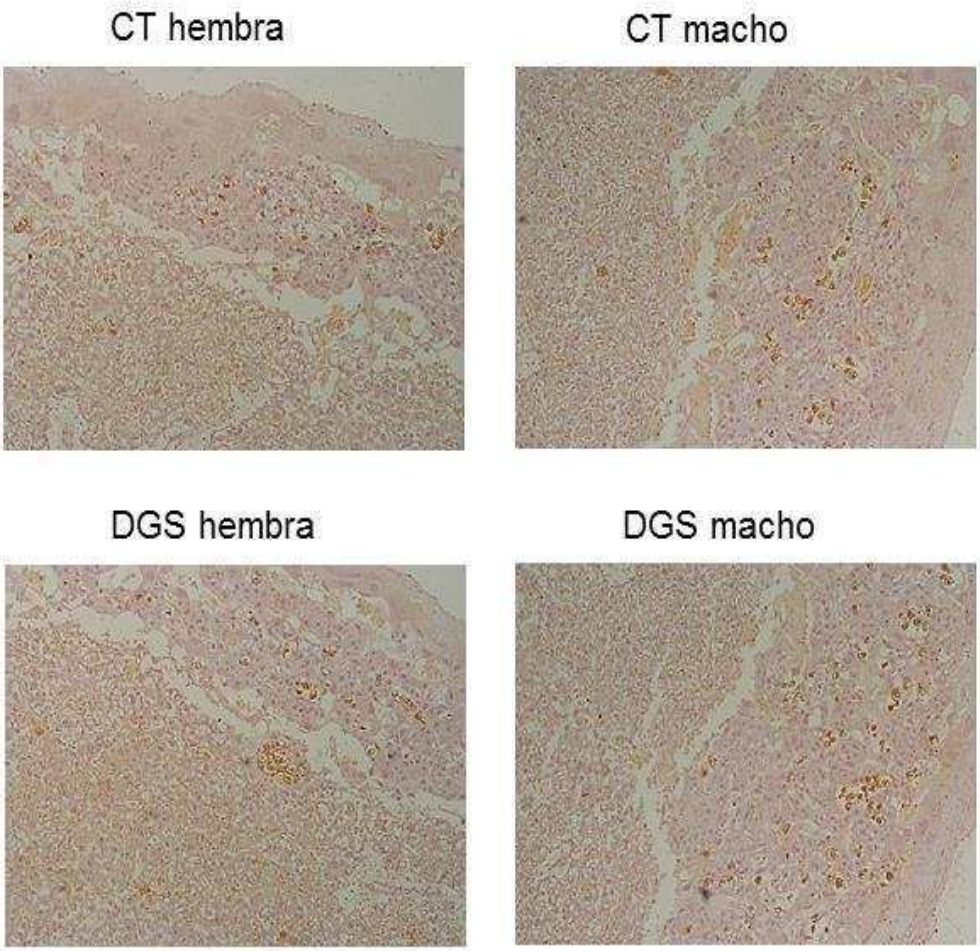
Niveles de ARNm (PCR) de A) la isoforma corta (ObRa) y de B) la isoforma larga (ObRb) del receptor de leptina en placentas a término de fetos hembra y macho de ratas del grupo CT y DGS. *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Figura 13: Niveles de proteína de la isoforma corta (ObRa) y la isoforma larga (ObRb) del receptor de leptina en placentas a término de ratas del grupo CT y DGS.



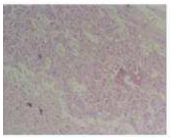
Niveles de proteína (western blot) de A) la isoforma corta (ObRa) y de B) la isoforma larga (ObRb) del receptor de leptina en placentas a término de fetos hembra y macho de ratas del grupo CT y DGS. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Figura 14: Niveles de proteína del receptor de leptina (ObR) en placentas a término de ratas del grupo CT y DGS.



	Zona de unión (ZU)		Decidua (Dec)		Laberinto (Lab)	
	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho
CT	212 ± 16	215 ± 16	205 ± 21	219 ± 18	197 ± 17	209 ± 20
DGS	200 ± 25	226 ± 27	193 ± 22	204± 24	228 ± 24	233 ± 23

CT negativo

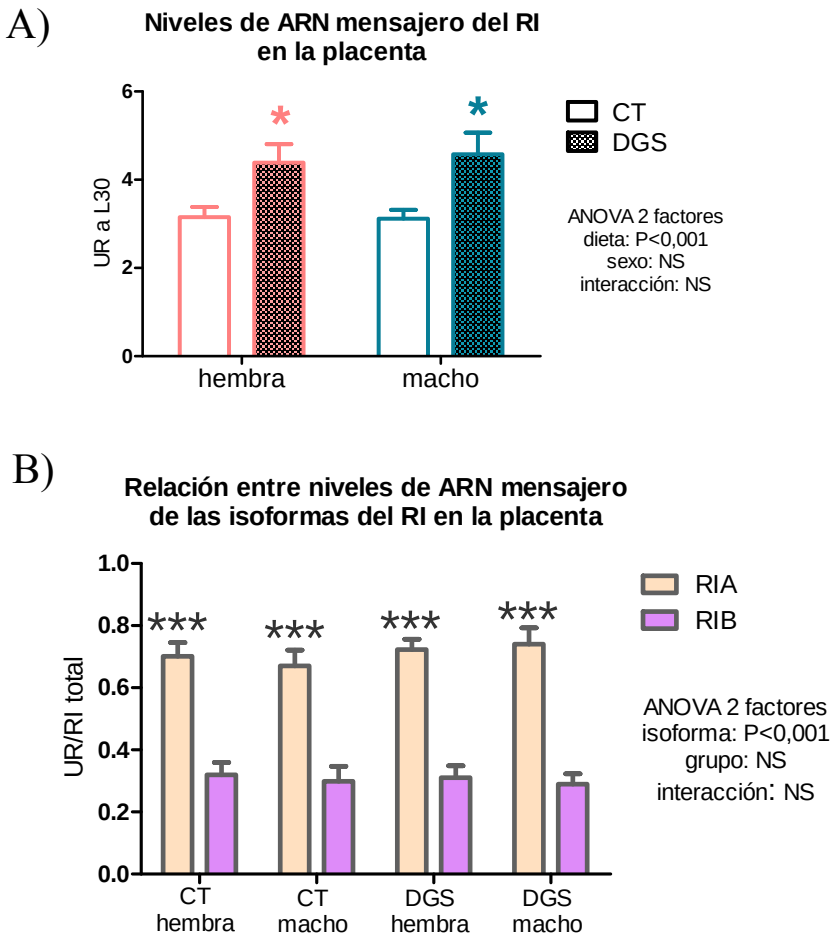


Inmunomarcación representativa (inmunohistoquímica) y cuantificación de los niveles de proteína del receptor total de leptina (ObR) en placentas a término de fetos hembra y macho de ratas del grupo CT y DGS. Magnificación: 200X. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

2.A.5. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de ARN mensajero del receptor de insulina placentario.

La detección de altos niveles de insulina en plasma materno y fetal, y el mayor peso placentario observado en el grupo DGS nos llevó a analizar los niveles de ARN mensajero de los receptores de insulina en la placenta. Detectamos mayores niveles de ARN mensajero del receptor total de insulina (RI) en las placentas del grupo DGS respecto de las controles ($P<0,05$, **Figura 15A**). En todas las placentas analizadas encontramos mayores niveles de ARN mensajero de la isoforma corta del receptor (RIA) ($P<0,001$), la cual se encuentra asociada a efectos biológicos de carácter mitogénicos, respecto de la isoforma larga (RIB), involucrada principalmente en funciones metabólicas (**Figura 15B**) *(Frasca y col. 1999)*. No encontramos diferencias en la relación de los niveles de ARN mensajero de las isoformas del receptor respecto del receptor total entre sexos o grupos dietarios (**Figura 15B**).

Figura 15: Niveles de ARN mensajero del receptor de insulina (RI) en placentas a término de ratas del grupo CT y DGS.



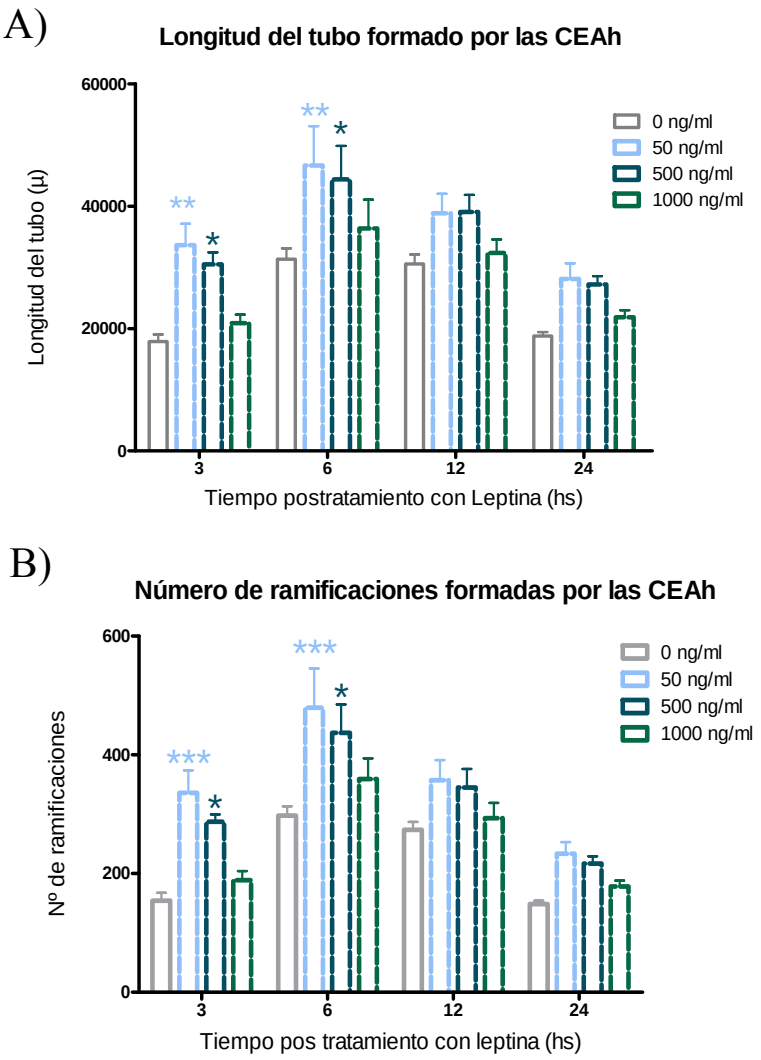
Niveles de ARNm (PCR) del A) receptor total de insulina (RI), y de B) la isoforma corta (RIA) y larga (RIB) del receptor de insulina respecto del RI en placentas a término de fetos hembra y macho de ratas del grupo CT y DGS. *P<0,05, ***P<0,001. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

2.A.6. Efecto de leptina fetal sobre la formación de tubos en células endoteliales humanas.

Es ampliamente conocida la capacidad de la leptina de estimular la proliferación de trofoblastos *(Maymo y col. 2011)*. También se ha evidenciado la capacidad de esta hormona de inducir la formación de tubos en células trofoblásticas sembradas en matrigel *(Basak y Duttaroy 2012)*. Dado que los fetos del grupo DGS presentan altos niveles de leptina en circulación, quisimos evaluar el rol de esta hormona en la angiogénesis placentaria. Para ello, utilizamos tres estrategias: 1) evaluamos la capacidad de la leptina de estimular la formación de tubos *in vitro* en células endoteliales de arteria placentaria humana (CEAh); 2) evaluamos los niveles de ARN mensajero del marcador de células endoteliales, el factor von Willebrand (vWF), en placentas del grupo CT y DGS y 3) evaluamos la capacidad de inyecciones intra-fetales de leptina de estimular en la placenta de ratas del grupo CT los niveles de ARN mensajero de vWF. La estrategia número 3 se abordará en la Parte B de este Capítulo, en el punto 2.B.4.

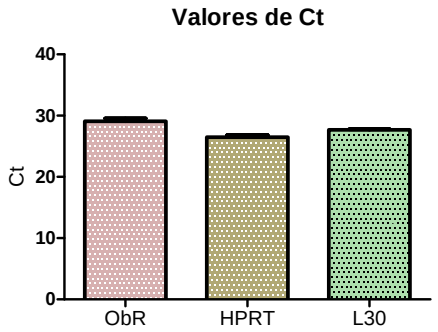
Para llevar a cabo la primer estrategia, utilizamos un modelo *in vitro* de CEAh cultivadas en matrigel. El tratamiento de las células con 50 ng/ml de leptina estimuló la formación de una red de tubos 2D sobre el matrigel. Tanto la longitud de los tubos como la cantidad de ramificaciones fue incrementada 3 y 6 horas después del tratamiento con leptina, sugiriendo una participación de esta hormona en el proceso de angiogénesis placentaria. La concentración de 500 ng/ml de leptina también produjo un incremento, de menor magnitud, en los dos parámetros de la red de tubos analizados 3 y 6 horas después del tratamiento ($P<0,05$, Figura 16 A y B). No se observaron efectos en los parámetros analizados al tratar a las células con 1000 ng/ml de hormona (Figura 16). La presencia del receptor total de leptina (ObR) en las CEAh fue comprobada mediante qPCR (Figura 17).

Figura 16: Efecto de la leptina sobre la longitud del los tubos y el número de conexiones de la red vascular formada por células endoteliales arteriales humanas (CEAh).



Efecto de la leptina sobre A) longitud del los tubos y B) número de conexiones de la red vascular formada por CEAh sembradas sobre matrigel luego del tratamiento con diferentes concentraciones de leptina. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. n=4. Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Figura 17: Valores de fluorecencia obtenidos en la reacción de amplificación del ARN mensajero del receptor total de leptina (ObR) en células endoteliales arteriales (CEA) humanas controles.

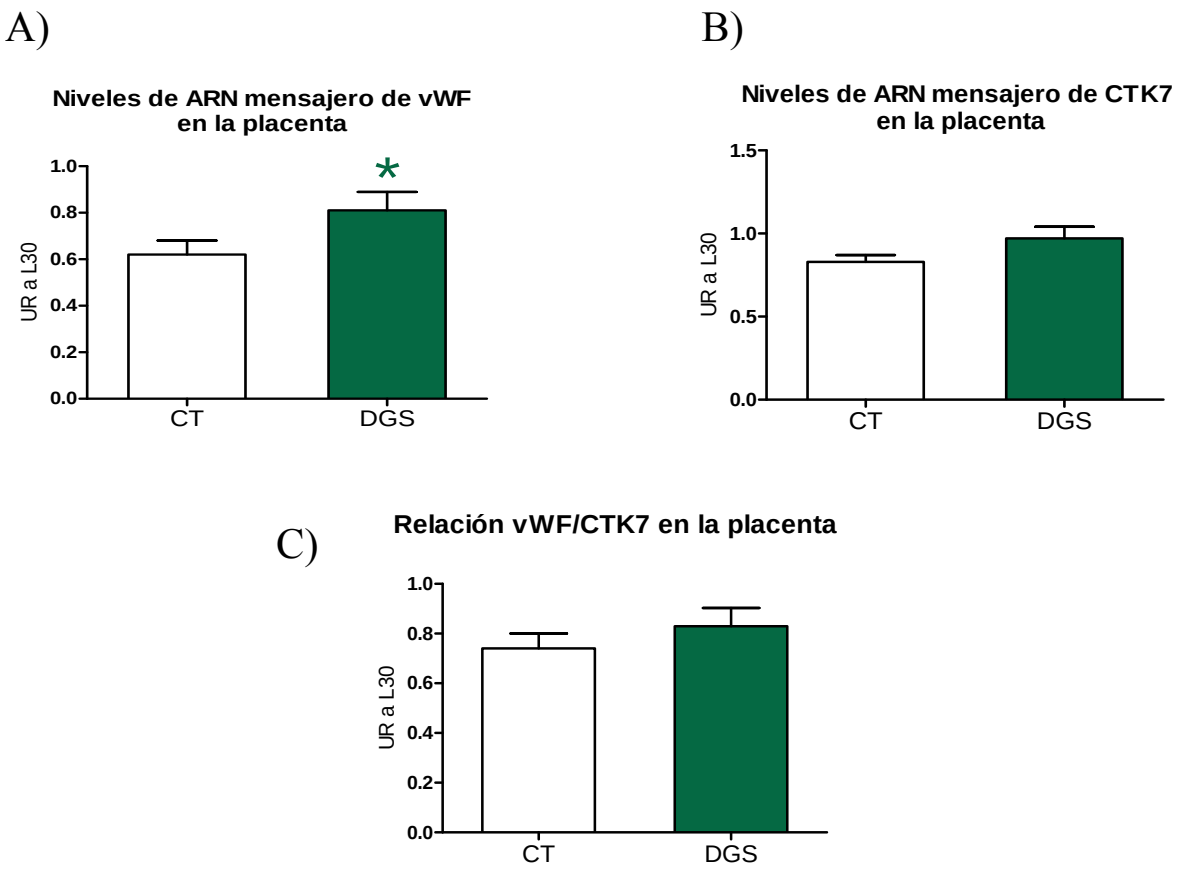


Valores de Ct = ciclo umbral de fluorescencia (qPCR) para el receptor total de leptina (ObR) y para los controles internos L30 y hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT) en CEAh controles. n=8.

2.A.7. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de ARN mensajero de vWF y CTK7.

Conociendo los efectos de leptina sobre la proliferación del trofoblasto y habiendo comprobado los efectos de la hormona sobre la formación de tubos en CEAh, abordamos la segunda estrategia y estudiamos en la placenta de ratas del grupo DGS y del grupo CT los niveles de ARN mensajero del marcador de células endoteliales von Willebrand (vWF). También analizamos los niveles de ARN mensajero del marcador de trofoblastos citoqueratina 7 (CTK7), parámetro de proliferación trofoblástica. Encontramos mayores niveles de ARN mensajero de vWF en las placentas del grupo DGS ($P<0,05$, **Figura 18A**), lo que indicaría una tasa angiogénica aumentada respecto del control. No observamos diferencias significativas respecto de los niveles de ARN mensajero de CTK7 ni de la relación vWF/CTK7 entre los grupos dietarios (**Figura 18 B y C**).

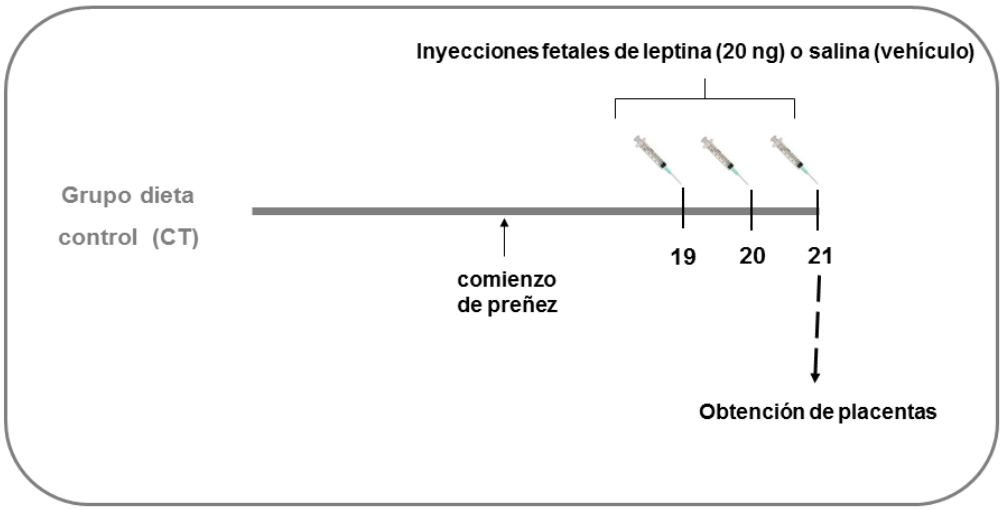
Figura 18: Niveles de ARN mensajero de vWF y CTK7 en placentas a término de ratas del grupo CT y DGS.



Niveles de ARNm (PCR) del A) marcador endotelial von Willebrand (vWF), del B) marcador trofoblástico citoqueratina 7 (CTK7) y de C) la relación vWF/CTK7 en placentas a término de fetos hembra y macho de ratas del grupo CT y DGS. *P<0,05. n=6. Test estadístico: t-Student.

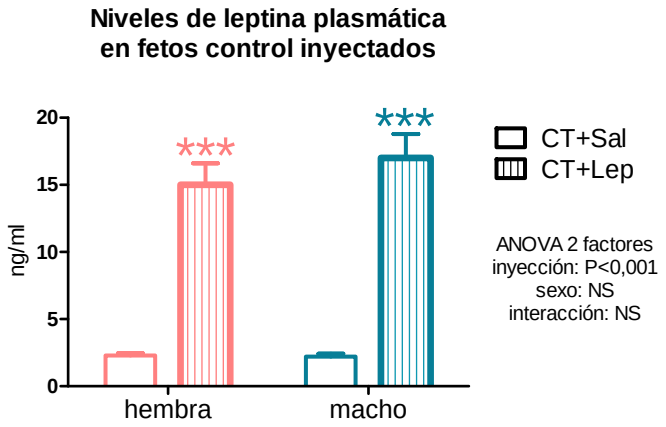
Parte B: Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre la placenta.

Con el objetivo de discernir entre los efectos de leptina materna y fetal sobre la placenta, utilizamos un modelo de inyecciones intra fetales de leptina. Trabajamos con ratas madres controles, inyectamos algunos de sus fetos con leptina con el fin de generar un aumento en los niveles de leptina fetal recreando el estado de hiperleptinemia fetal observado en el modelo de DGS. En paralelo otro grupo de fetos de la misma rata fue inyectado con solución salina (vahículo) para ser utilizados como controles. Se realizaron tres inyecciones de 20 ng/ml de leptina los días 19, 20 y 21 de gestación (**Esquema 18**). El día 21 de gestación los fetos inyectados con leptina presentaban altos niveles de la hormona en plasma respecto de los fetos inyectados con el vehículo (P<0,001), sin encontrarse diferencias género-dependientes (**Figura 19**).



Esquema 18: Modelo experimental para la obtención de placentas provenientes de fetos control inyectados con leptina.

Figura 19: Niveles de leptina plasmática en fetos CT inyectados con leptina (CT+Lep) o salina (CT+Sal).



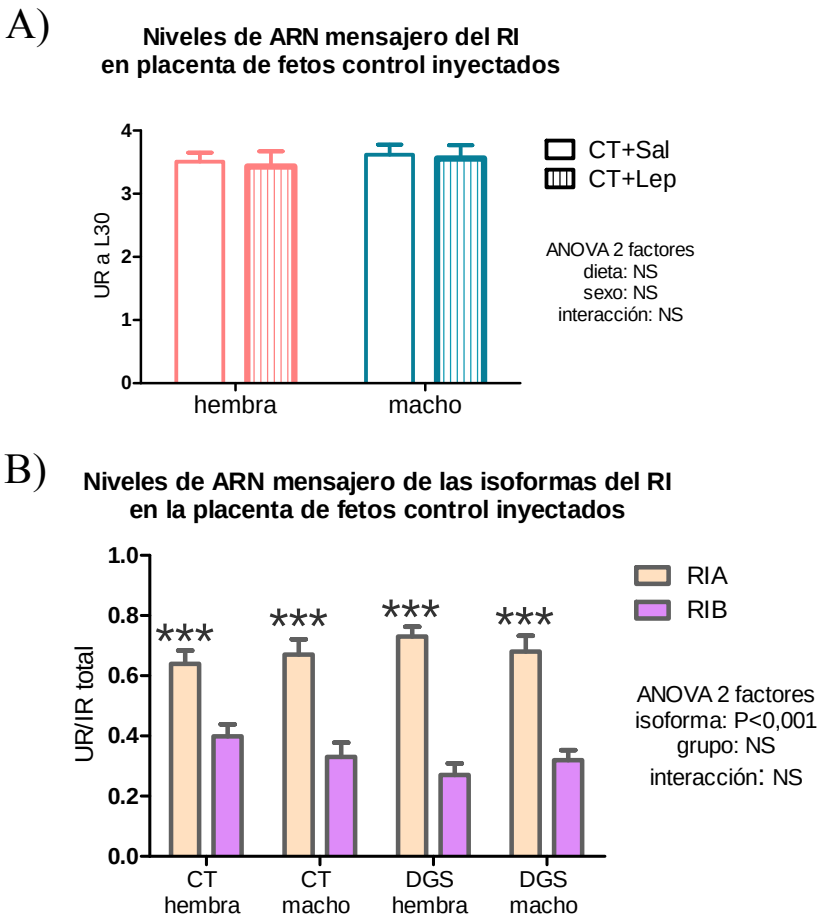
Niveles de leptina plasmática en fetos control inyectados con salina (CT+Sal) o leptina (CT+Lep). ***P<0,001. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

2.B.1. Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre los niveles de ARN mensajero del receptor de insulina placentario.

Teniendo en cuenta el aumento de los niveles de ARN mensajero del receptor de insulina (RI) placentario observado en el grupo DGS, nos propusimos investigar si este incremento era inducido por la hiperleptinemia fetal.

No encontramos diferencias en los niveles de ARN mensajero del RI al comparar las placentas de fetos inyectados con leptina respecto de los inyectados con vehículo (**Figura 20A**). Una vez más observamos mayores niveles de ARN mensajero relativos de RIA respecto de RIB (P<0,001, **Figura 20B**), por lo indica que las inyecciones con leptina no modifican esta relación. No se observaron diferencias género-dependientes en este estudio.

Figura 20: Niveles de ARN mensajero del receptor total de insulina (RI) en placentas a término de ratas del grupo CT inyectado con salina (CT+Sal) y CT inyectado con leptina (CT+Lep).

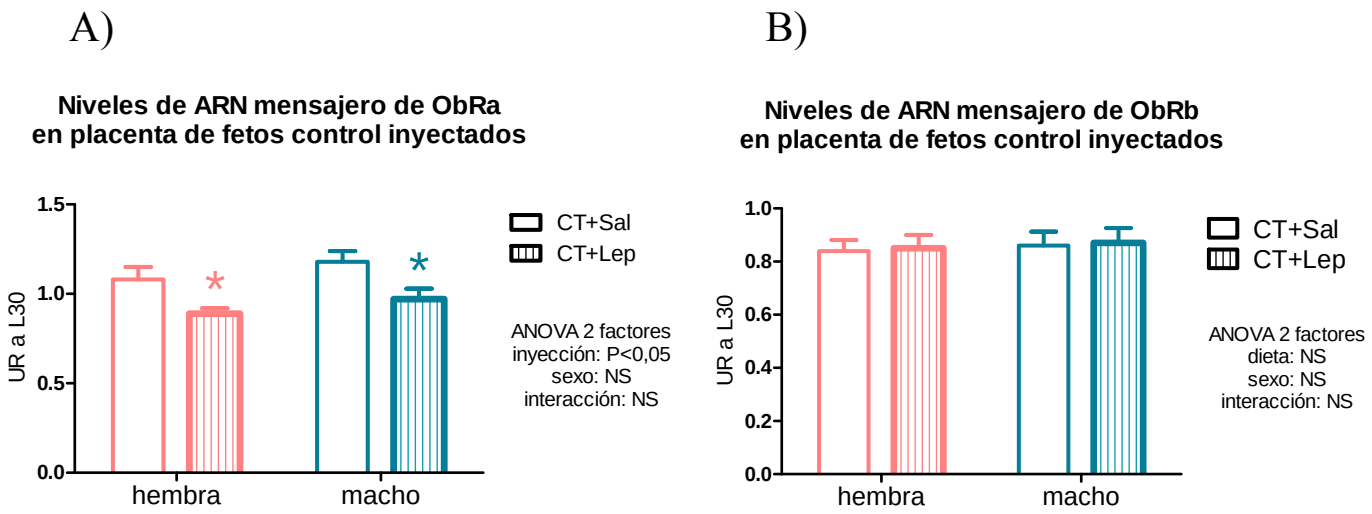


Niveles de ARNm (PCR) del A) receptor total de insulina (RI) y B) de la isoforma corta (RIA) y de la isoforma larga (RIB) del receptor de insulina respecto del RI en placentas a término de fetos control inyectados con salina (CT+Sal) o leptina (CT+Lep). ***P<0,001. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

2.B.2. Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre los niveles de ARN mensajero del receptor de leptina placentario.

Poco se conoce del efecto que pudiera tener la leptina fetal sobre la placenta. Es por ello que se estudió el posible rol de la leptina fetal sobre su propio receptor (ObR) en la placenta. Encontramos que la inyección con leptina produjo una disminución de los niveles de ARN mensajero de la isoforma corta del receptor ObRa tanto en hembras como en machos (P<0,05, **Figura 21A**). Esta disminución de ObRa es similar a la observada en las placentas del grupo DGS en relación al control (**Figura 12A**). No encontramos variaciones en los niveles de ARN mensajero de la isoforma larga (ObRb) debido al tratamiento intra-fetal con leptina (**Figura 21B**).

Figura 21: Niveles de ARN mensajero de la isoforma corta (ObRa) y larga (ObRb) del receptor de leptina en placentas a término de ratas del grupo CT inyectado con salina (CT+Sal) y CT inyectado con leptina (CT+Lep).

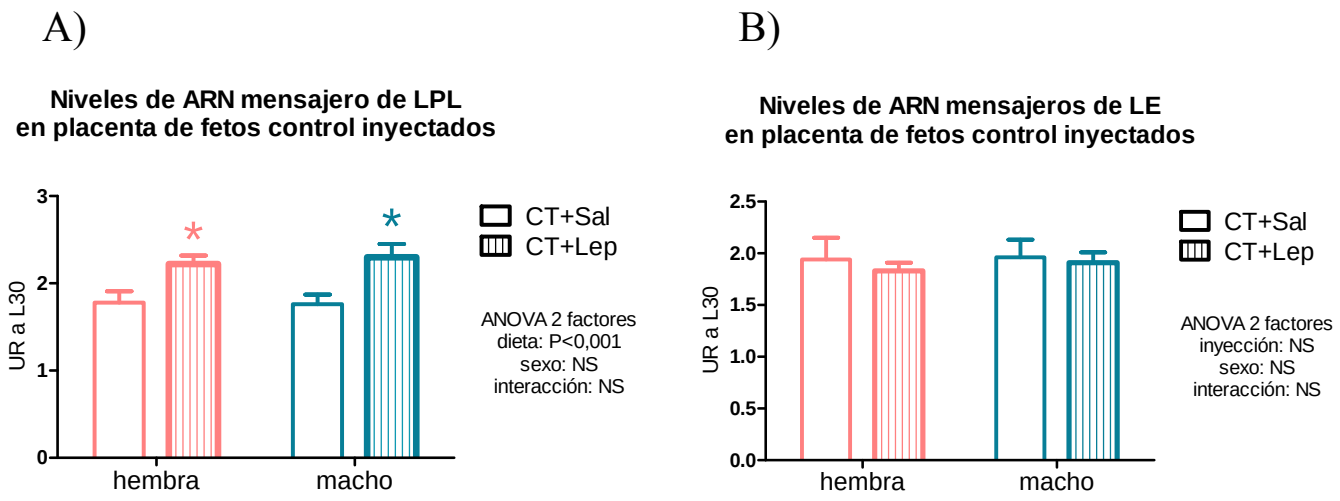


Niveles de ARNm (PCR) de A) la isoforma corta (ObRa) y B) la isoforma larga (ObRb) del receptor de leptina en placentas a término de fetos control inyectados con salina (CT+Sal) o leptina (CT+Lep). *P<0,05. n=6.
Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

2.B.3. Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre los niveles de ARN mensajero de lipasas placentarias.

Conociendo la capacidad de leptina de modular la lipólisis placentaria *(White y col. 2004, White y col. 2006)*, estudiamos el efecto de la leptina fetal sobre los niveles de ARN mensajero de LPL y LE. Encontramos un aumento de los niveles de ARN mensajero de LPL en las placentas de fetos inyectados con leptina (P<0,05, **Figura 22A**). Este aumento de LPL es similar a lo observado en las placentas del grupo DGS en relación al control (**Figura 10A**). No observamos diferencias respecto de los niveles de ARN mensajero de LE debido a las inyecciones (**Figura 22B**), ni diferencias género-dependientes en ninguna de las lipasas analizadas (**Figura 22**).

Figura 22: Niveles de ARN mensajero de LPL y LE en placentas a término de ratas del grupo CT inyectado con salina (CT+Sal) y CT inyectado con leptina (CT+Lep).



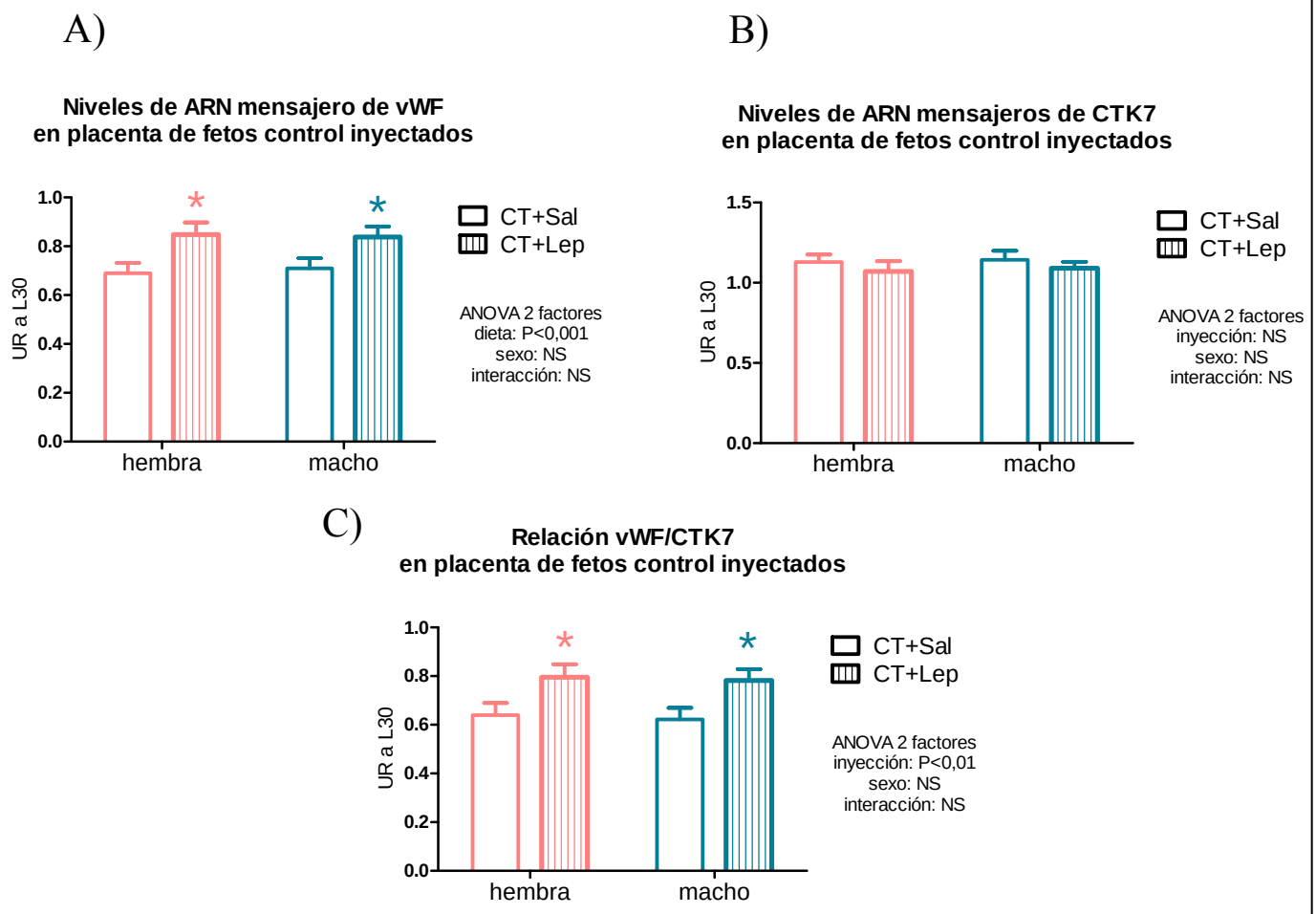
Niveles de ARNm (PCR) de lipoproteinlipasa (LPL) y lipasa endotelial (LE) en placentas a término de fetos control inyectados con salina (CT+Sal) o leptina (CT+Lep). *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

2.B.4. Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre los niveles de ARN mensajero de vWF y CTK7.

Finalmente, y como parte de la tercera estrategia del estudio realizado para evaluar la capacidad angiogénica de leptina, estudiamos el efecto de la leptina fetal sobre los niveles de ARN mensajero de vWF y CTK7. Encontramos un aumento de los niveles de ARN mensajero de vWF en

las placentas de fetos inyectados con leptina (P<0,05, **Figura 23A**). Este aumento es similar al observado en las placentas del grupo DGS en relación al control (Figura 16A). No observamos diferencias significativas respecto de los niveles de ARN mensajero de CTK7 (**Figura 23B**) y encontramos un aumento del cociente vWF/CTK7 en respuesta a la administración intra-fetal de leptina (P<0,05, **Figura 23C**). Ninguno de los resultados mecionados presentó diferencias género-dependientes (**Figura 23**).

Figura 23: Niveles de ARN mensajero de vWF y CTK7 en placentas a término.



Niveles de ARNm (PCR) del A) marcador endotelial factor von Willebrand (vWF), del B) marcador trofoblástico citoqueratina 7 (CTK7) y de C) la relación vWF/CTK7 en placentas a término de fetos control inyectados con salina (CT+Sal) o leptina (CT+Lep). n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Resumen del Capítulo 2

Pudimos evidenciar que las placentas del grupo DGS presentan una mayor producción de óxido nítrico y elevados niveles de peroxidación lipídica, respecto de las placentas provenientes de ratas alimentadas con la dieta control.

El exceso de triglicéridos plasmáticos encontrado en las madres, originado a partir del exceso de lípidos proveniente de la dieta, sería metabolizado y transferido al feto en desarrollo a través de la placenta. Una mayor transferencia de lípidos desde la madre hacia el feto en el grupo DGS podría explicar el exceso de triglicéridos plasmáticos encontrado en el plasma fetal. El aumento de los niveles de ARN mensajero de LPL y la ausencia de acumulación lipídica en las placentas en este grupo a pesar del exceso de triglicéridos plasmáticos maternos y fetales apoyarían la hipótesis de alta transferencia de nutrientes placentaria en el grupo DGS.

El mayor peso fetal refleja simultáneamente la capacidad fetal de obtener nutrientes de la madre a través de la placenta y la capacidad placentaria de transferencia de sustancias. Vinculado a este último, encontramos en la placenta del grupo DGS, un incremento de los niveles de ARN mensajero del marcador angiogénico vWF y de la LPL, estrechamente relacionada a la transferencia lipídica.

En el grupo DGS, los elevados niveles de insulina en plasma materno y fetal, junto al incremento de los niveles de ARN mensajero del receptor de insulina (y con predominio de la isoforma mitogénica), estarían potenciando el efecto anabólico de insulina, contribuyendo así al crecimiento placentario, el cual junto a una mayor transferencia de nutrientes favorecería un mayor crecimiento fetal.

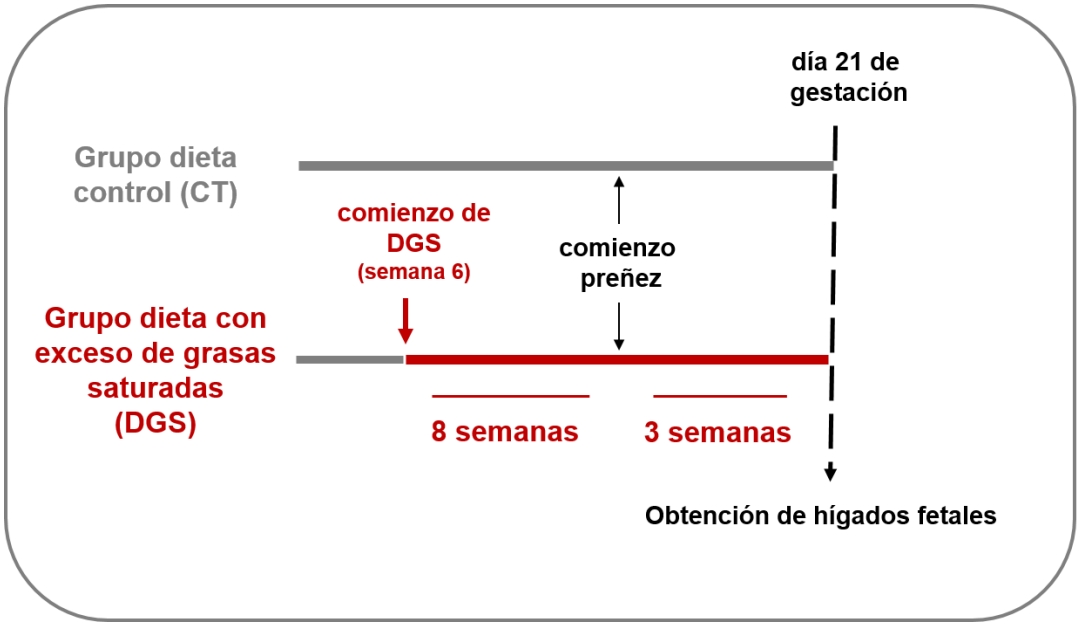
El ensayo de matrigel evidencia la capacidad de la leptina fetal de estimular la proliferación de células endoteliales y la formación de tubos, y las inyecciones intra-fetales de leptina permiten sugerir que la leptina fetal posee un rol en el aumento de los niveles de ARN mensajero del marcador endotelial vWF y de LPL. Estos efectos son similares a los observados en el grupo DGS, lo que nos lleva a pensar que la hiperleptinemia fetal del grupo DGS estaría contribuyendo al aumento de vWF y LPL, favoreciendo el crecimiento del área de intercambio intrauterino y el transporte placentario.

Las inyecciones intra-fetales de leptina sugieren también que la leptina fetal disminuye los niveles de ARN mensajero de ObRa en la placenta. Estos efectos son similares a los producidos en la placenta por el exceso de grasas saturadas en la dieta materna en el grupo DGS, lo que nos lleva a pensar que es la hiperleptinemia del grupo DGS sería en parte la responsable de estos cambios.

Capítulo 3: Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna y de inyecciones intra-fetales de leptina sobre el hígado fetal

Parte A: Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre el hígado fetal.

Con el objetivo de estudiar la regulación de un órgano clave en el metabolismo lipídico, se estudió el hígado fetal. Para abordar este estudio, se utilizaron los hígados de fetos de 21 días de gestación provenientes de ratas alimentadas con dieta control (CT) o con dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) (**Esquema 19**).

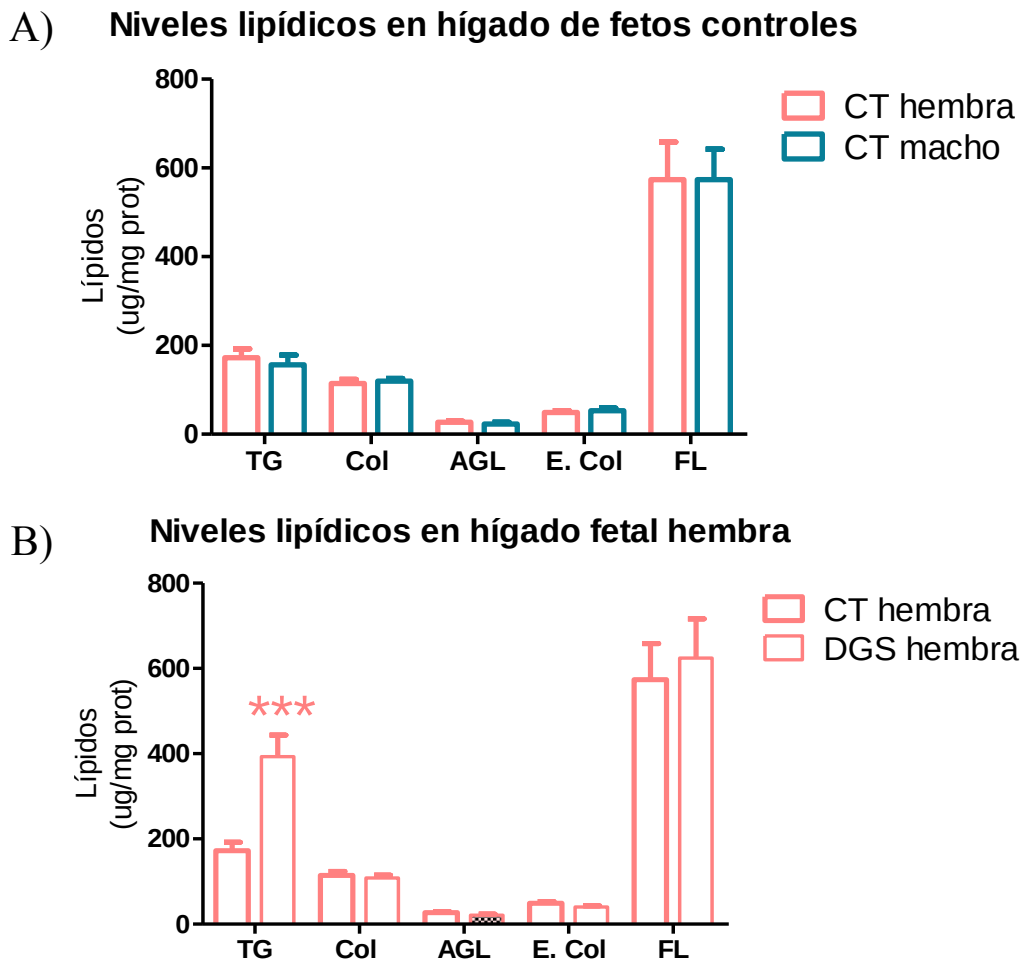


Esquema 19: Modelo experimental para la obtención de hígados fetales provenientes de ratas del grupo control (CT) y de ratas alimentadas con exceso de grasas saturadas (DGS).

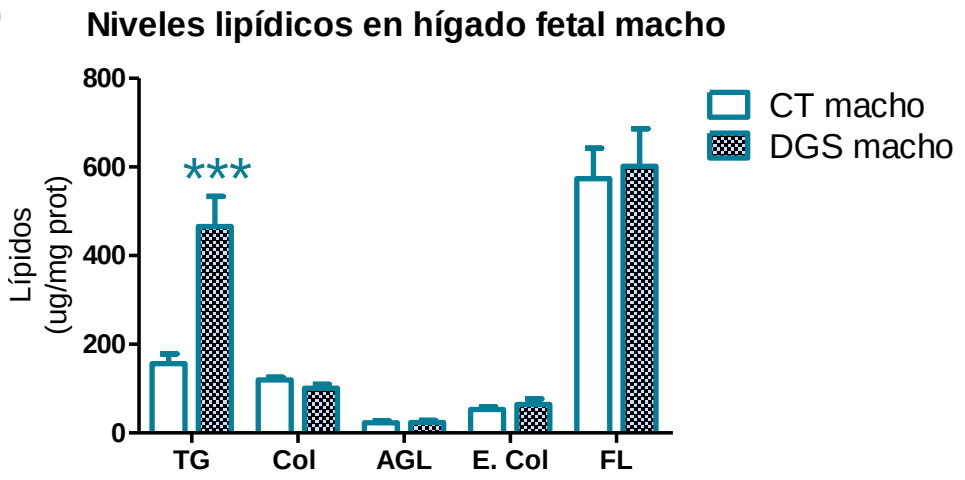
3.A.1. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de lípidos en el hígado fetal.

El incremento de triglicéridos observado en el plasma fetal del grupo DGS nos condujo a estudiar los niveles de lípidos hepáticos, sospechando que el exceso de triglicéridos plasmático podría contribuír a una sobreacumulación hepática de lípidos. En el grupo control, no observamos diferencias en los niveles de lípidos al comparar los hígados de fetos hembra y macho (**Figura 24A**), mientras que encontramos una sobreacumulación de triglicéridos en los hígados de fetos hembra y macho provenientes de las ratas alimentadas con un exceso de grasas saturadas al compararlos con el grupo control (P<0,001, **Figura 24 B y C**).

Figura 24: Niveles de lípidos en hígados de fetos provenientes de ratas del grupo CT y DGS.



C)



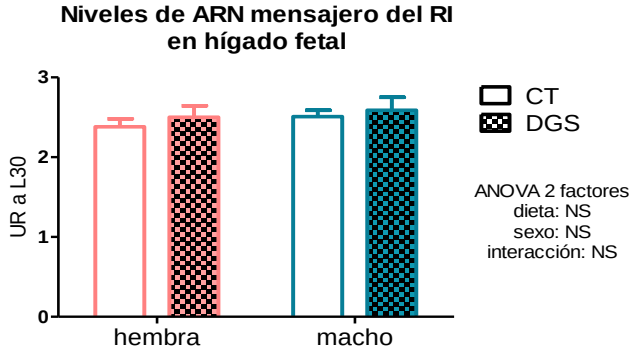
Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en el hígado de fetos A) hembra y macho provenientes de ratas del grupo control (CT) y en el hígado de fetos B) hembra y C) macho de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo CT y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (
GS). *
*P<0,001, n=6. Test estadístico: t Student. TG: triglicéridos, Col: colesterol, AGL: ácidos grasos libres, E. Col: ésteres

3.A.2. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la expresión del receptor de insulina en el hígado fetal.

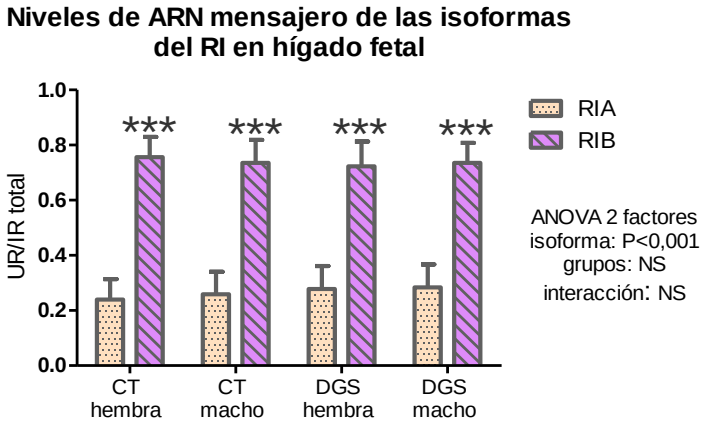
Dado que la insulina es una hormona anabólica que podría estar propiciando el aumento de la deposición lipídica y contribuyendo así a la sobreacumulación de lípidos en el hígado, decidimos analizar la expresión del RI en el hígado fetal. No encontramos diferencias en los niveles de ARN mensajero (**Figura 25A**) ni de proteína (**Figura 24C**) del RI en los hígados fetales de los grupos dietarios en estudio. En todos los hígados analizados encontramos mayores niveles de ARN mensajero de la isoforma larga del receptor (RIB) (P<0,01, **Figura 25B**), la cual se encuentra asociada principalmente a funciones metabólicas, respecto de la isoforma corta (RIA), la cual se asocia a funciones principalmente mitogénicas. Los resultados mencionados no presentaron diferencias género-dependientes (**Figura 25**).

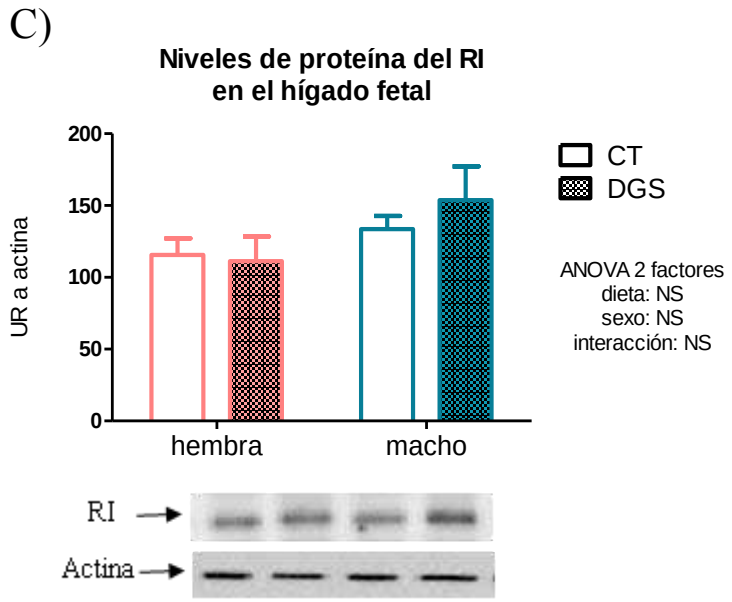
Figura 25: Niveles de ARN mensajero y proteína del receptor de insulina (RI) en hígados de fetos provenientes de ratas del grupo CT y DGS.

A)



B)





Niveles de ARNm (PCR) del A) receptor total de insulina (RI), y de B) la isoforma corta (RIA) y larga (RIB) del receptor de insulina respecto del RI en hígados de fetos de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo CT y DGS. C) niveles de proteína (Western blot) del receptor total de insulina (RI) en hígados de fetos de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo CT y DGS. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

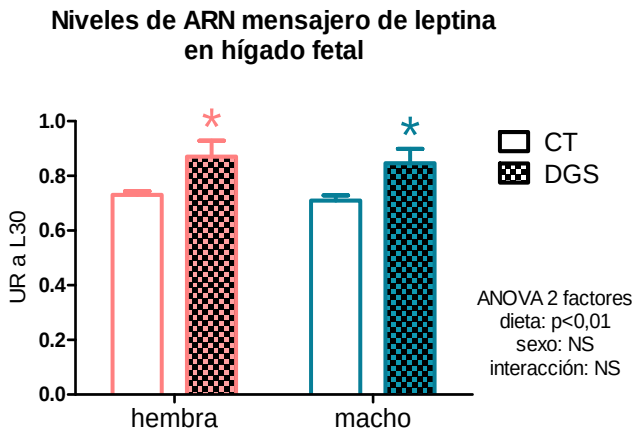
3.A.3. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la expresión de leptina y los receptores de leptina en el hígado fetal.

Conociendo el efecto catabólico de leptina sobre el metabolismo de lípidos *(Wein y col. 2007)*, nos llamó la atención que, a pesar de los elevados niveles de leptina en circulación fetal, el hígado fetal presentara sobreacumulación de lípidos. Es por ello que estudiamos los niveles de ARN mensajero de leptina y la expresión de sus receptores (ObR) en este tejido para conocer la producción local de la hormona y su potencial accionar. Existen varias isoformas de ObR generadas como producto de splicing alternativo del ARN mensajero o procesos proteolíticos *(Tartaglia 1997)*. Evaluamos los niveles de ARN mensajero y de proteína de la isoforma corta (ObRa) y la isoforma larga (ObRb) del receptor.

- **Niveles de ARN mensajero de leptina en el hígado fetal**

Encontramos que la dieta materna con exceso de grasas saturadas induce un aumento de los niveles de ARN mensajero de leptina en el hígado fetal hembra y macho (P<0,05) (**Figura 26**).

Figura 26: Niveles de ARN mensajero de leptina en hígados de fetos provenientes de ratas del grupo CT y DGS.

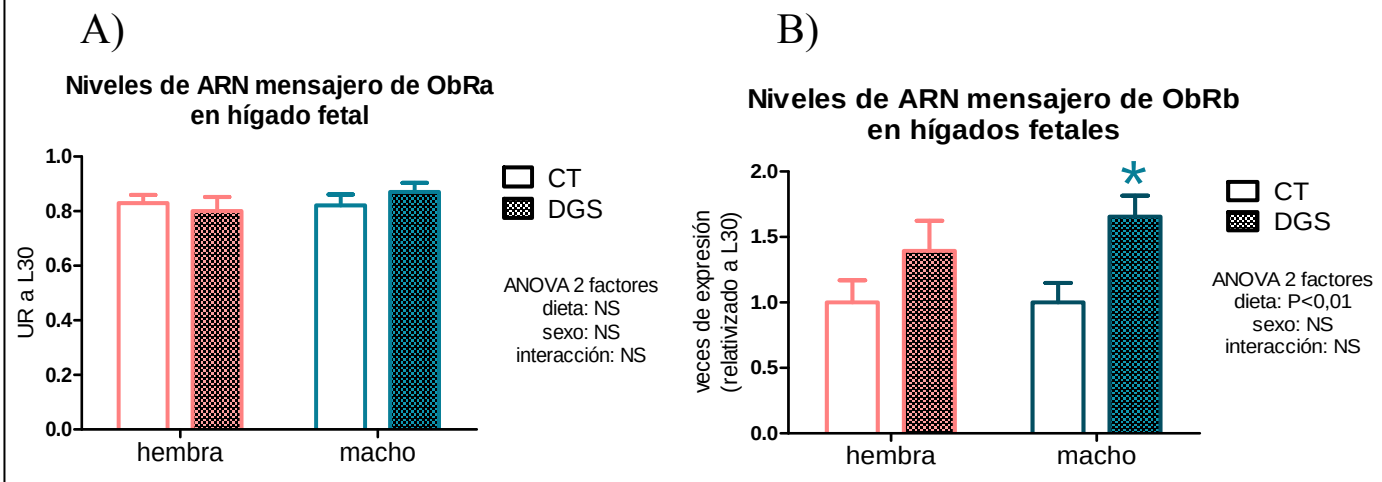


Niveles de ARNm (PCR) de leptina en hígados de fetos de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo CT y DGS. *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

- **Expresión del receptor leptina en el hígado fetal**

No detectamos diferencias respecto a los niveles de ARN mensajero de ObRa al comparar los grupos dietarios (**Figura 27A**). Sin embargo, observamos un aumento de los niveles de ARN mensajero de ObRb en los hígados fetales macho provenientes del grupo DGS (**Figura 27B**).

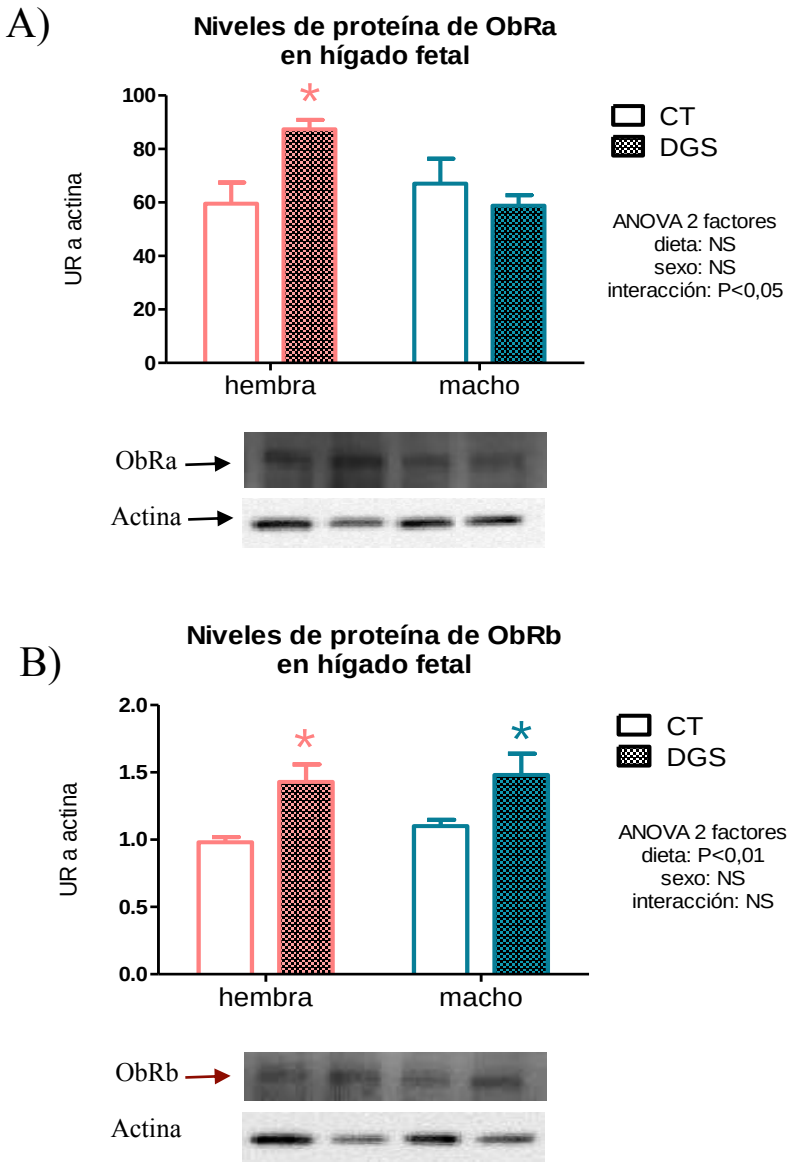
Figura 27: Niveles de ARN mensajero de la isoforma corta (ObRa) y la isoforma larga (ObRb) del receptor de leptina en hígados de fetos provenientes de ratas del grupo CT y DGS.



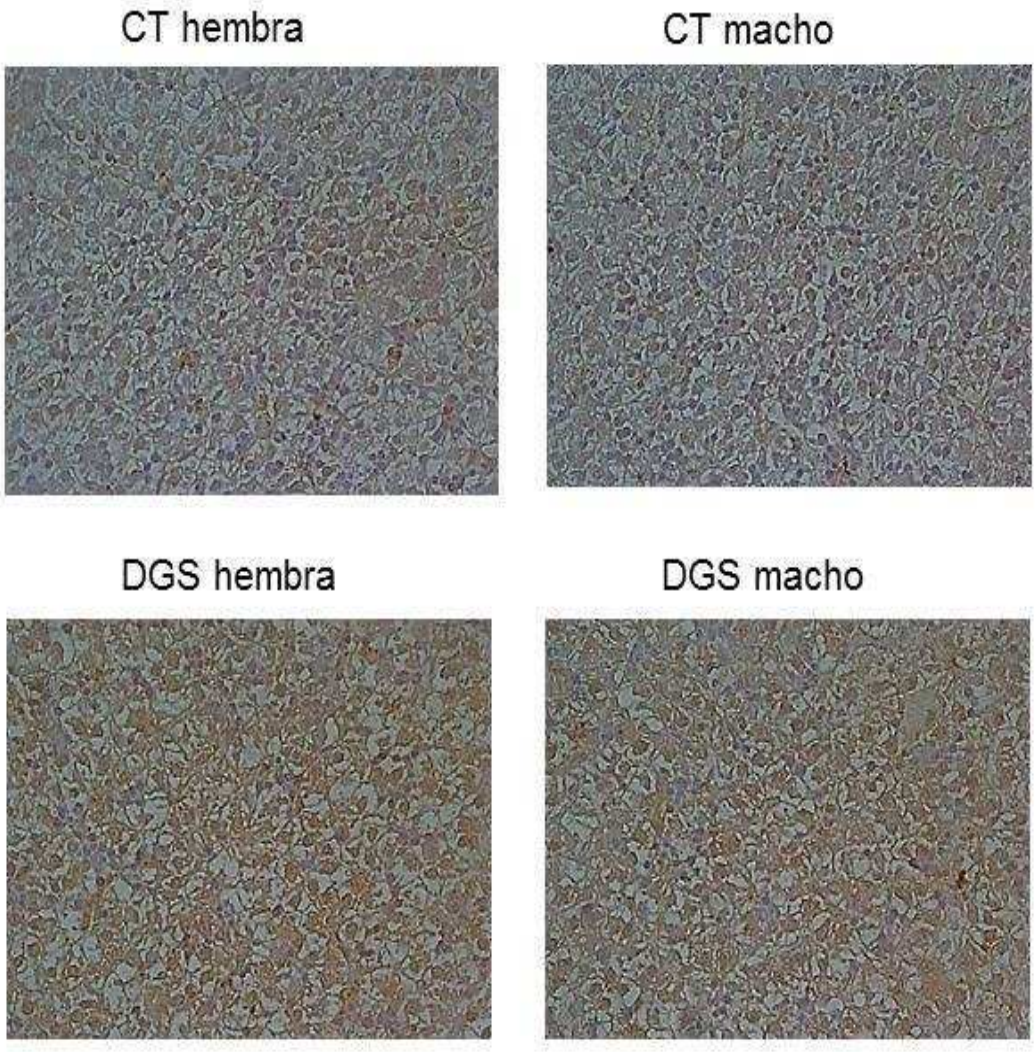
Niveles de ARNm (A: PCR, B: qPCR) de A) la isoforma corta (ObRa) y de B) la isoforma larga (ObRb) del receptor de leptina en hígados de fetos de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo CT y DGS. Los resultados de la qPCR fueron analizados mediante el método ΔΔCt. *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

En relación a la expresión proteica, encontramos mayores niveles de proteína de ObRa en los hígados fetales hembra del grupo DGS (P<0,05, **Figura 28A**) y mayores niveles de ObRb en los hígados fetales tanto hembra como macho del grupo DGS (P<0,05, **Figura 28B**). El análisis del receptor total (ObR) por inmunohistoquímica mostró mayores niveles del receptor en el grupo DGS respecto del control, sin observarse diferencias género-dependientes (**Figura 27C**).

Figura 28: Niveles de proteína de la isoforma corta (ObRa), la isoforma larga (ObRb) y el receptor total (ObR) de leptina en hígados de fetos provenientes de ratas del grupo CT y DGS.



C)



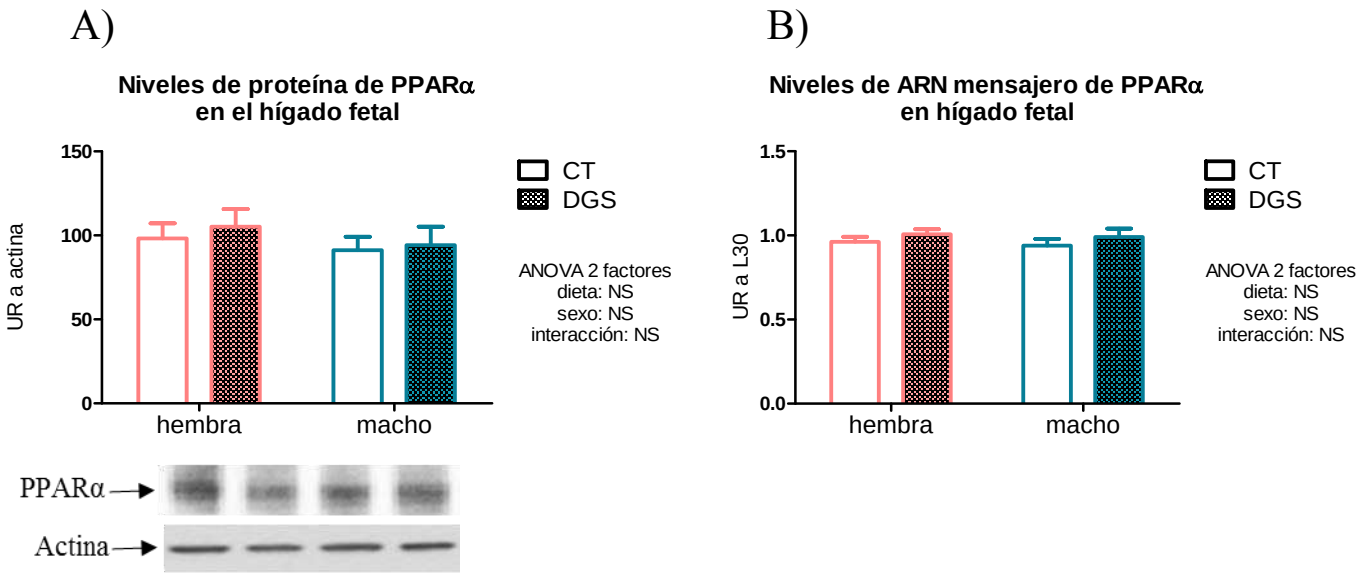
	CT	DGS
Hembra	229 ± 31,0	465 ± 49 *
Macho	330 ± 39,8	593 ± 89 **

Niveles de proteína (Western blot) de A) la isoforma corta del receptor de leptina (ObRa) y B) la isoforma larga del receptor de leptina (ObRb) y C) inmunomarcación representativa (inmunohistoquímica) y cuantificación de los niveles de proteína del receptor total de leptina (ObR) en hígados de fetos de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo CT y DGS. Magnificación: 200X. *P<0,05, **P<0,01. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

3.A.4. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de ARN mensajero de PPARα, ACO, CPT1 y LPL, genes involucrados en el catabolismo de lípidos en el hígado fetal.

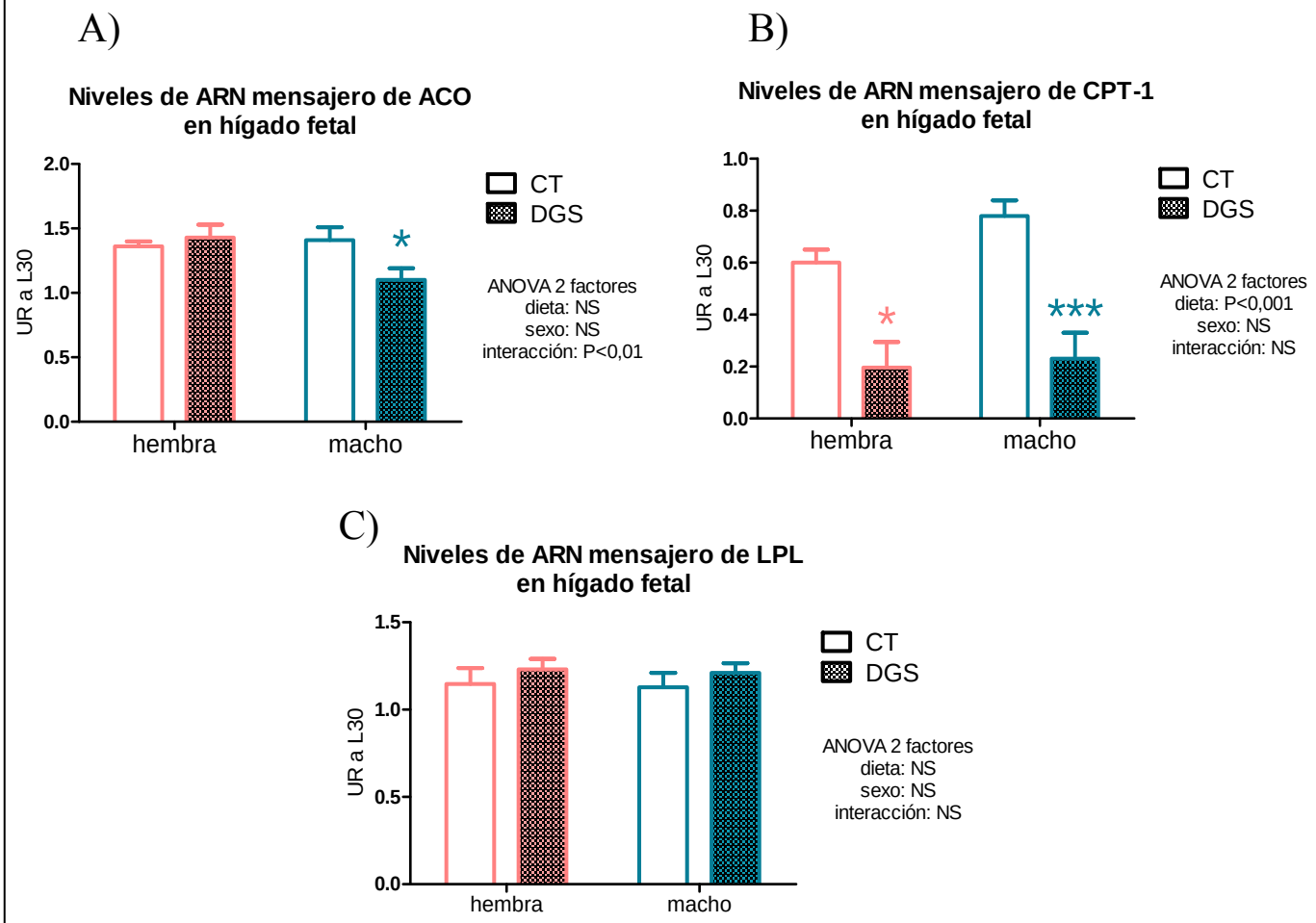
La leptina regula la expresión de numerosos genes involucrados en el catabolismo de lipídos *(Wein y col. 2007)*. En particular, observamos que en la placenta regula positivamente los niveles de ARN mensajero de LPL (**Figura 22A**). Además, numerosos autores mostraron que, mediante la activación del receptor activado por proliferadores peroxisomales α (PPARα), la leptina regula positivamente la expresión de acil-CoA Oxidasa (ACO) y carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), enzimas lipolíticas claves en los procesos de β-oxidación mitocondrial y peroxisomal, respectivamente *(Lee y col. 2002)*. Es por esto que resultó llamativo que, a pesar de los incrementados niveles de leptina en circulación y la elevada expresión de su receptor en los hígados fetales del grupo DGS, estos órganos presentaran acumulación de lípidos. Decidimos entonces analizar los niveles de ARN mensajero de algunos genes involucrados en el catabolismo lipídico de este órgano. No encontramos diferencias en los niveles de ARN mensajero ni de proteína de PPARα al comparar los dos grupos dietarios estudiados (**Figura 29**). Sin embargo, observamos una disminución de los niveles de ARN mensajero de ACO en el hígado de fetos macho ($P<0,05$, **Figura 30A**) y de CPT1 en el hígado de fetos hembra y macho ($P<0,05$, **Figura 30B**) del grupo DGS respecto del grupo control. No observamos diferencias en los niveles de ARN mensajero de LPL al comparar los grupos dietarios ni los géneros (**Figura 30C**).

Figura 29: Niveles de ARN mensajero y proteína de PPARα en hígados de fetos provenientes de ratas del grupo CT y DGS.



Niveles de A) ARNm (PRC) y B) de proteína (Western blot) de PPARα en hígados de fetos de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo CT y DGS. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Figura 30: Niveles de ARN mensajero de ACO, CPT1 y LPL en hígados de fetos provenientes de ratas del grupo CT y DGS.



Niveles de ARNm (PCR) de A) ACO B) CPT1 y C) LPL en hígados de fetos de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo CT y DGS. *P<0,05, ***P<0,001. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

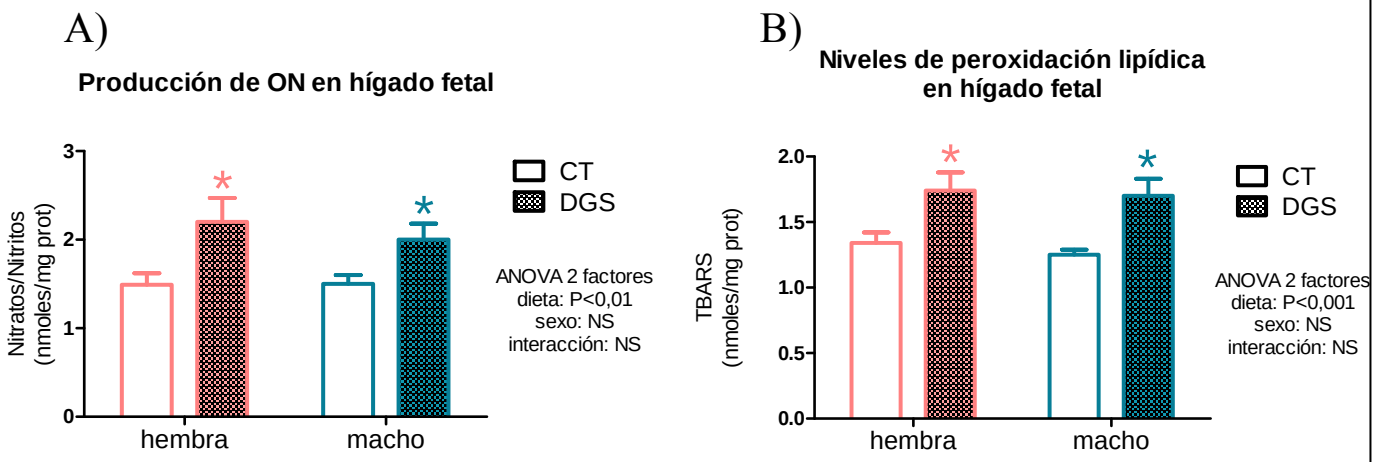
3.A.5. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre parámetros de estrés oxidativo y de detoxificación hepática en el hígado fetal.

- **Estrés oxidativo**

Sabiendo que la sobreacumulación lipídica genera un estado pro-inflamatorio y pro-oxidante en el tejido hepático *(Bradbury 2006)*, analizamos algunos parámetros vinculados al estrés oxidativo en el hígado fetal *(Rathore y col. 1998)*. Encontramos que la dieta materna con exceso de grasas

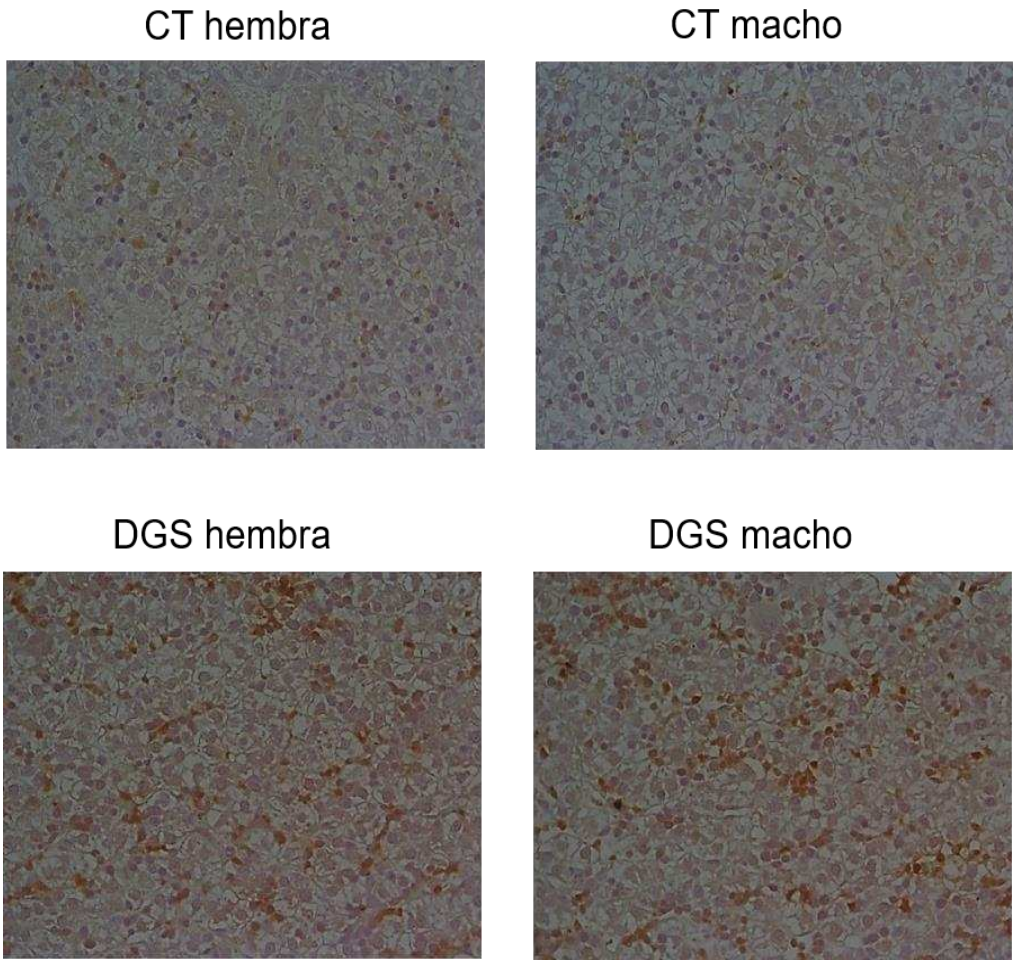
saturadas (DGS) produce un aumento de la producción de óxido nítrico y de los niveles de lipoperóxidos tanto en hembras como en machos (P<0,05, **Figura 31**). También encontramos mayores niveles de proteínas nitradas, indicador de daño producido por peroxinitritos *(Stadtman y Levine 2003)*, en los hígados de fetos hembra y machos del grupo DGS (**Figura 32**).

Figura 31: Niveles de producción de óxido nítrico y de peroxidación lipídica en hígados de fetos provenientes de ratas del grupo CT y DGS.



Niveles de producción de óxido nítrico (medición de nitratos/nitritos por ensayo de Griess) y niveles de peroxidación lipídica (ensayo de TBARS) en hígados de fetos de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo CT y DGS. *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Figura 32: Niveles de proteínas nitradas en hígados de fetos provenientes de ratas del grupo CT y DGS.



	CT	DGS
Hembra	43 ± 5,2	79 ± 8,9 *
Macho	48 ± 5,8	90 ± 15,0 *

CT negativo

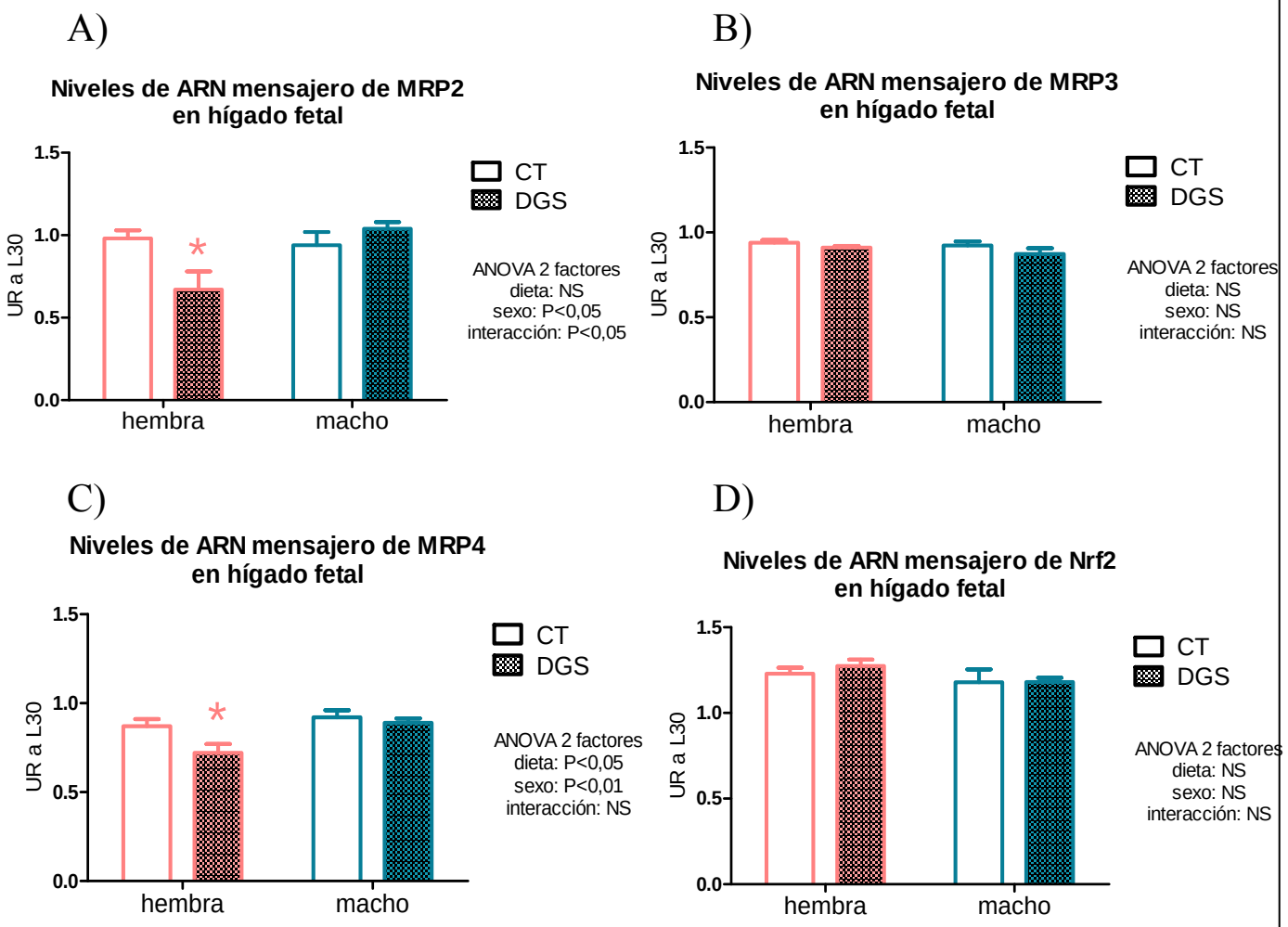
Inmunomarcación representativa (inmunohistoquímica) y cuantificación de proteínas nitradas en tirosina en hígados de fetos de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo CT y DGS. Magnificación: 200X. *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

- **Detoxificación y función hepática**

Estudiamos el efecto de la dieta materna con exceso de grasas saturadas sobre los niveles de ARN mensajero de trasportadores involucrados en la excreción y detoxificación de xenobióticos y

endobióticos. Para ello, analizamos a las proteínas asociadas a resistencia a multidrogas (MRPs) y a uno de sus reguladores transcripcionales, el factor nuclear derivado de eritroide 2 similar al 2 (Nrf2), factor de transcripción involucrado en la respuesta antioxidante y de detoxificación hepática *(Klaassen y Aleksunes 2010, Ma 2013)*. El factor de transcripción Nrf2 no mostró diferencias en sus niveles de ARN mensajero entre los grupos dietarios (**Figura 33D**), sin embargo, encontramos una disminución del ARN mensajero de MRP2 y MRP4 en el hígado fetal hembra proveniente del grupo DGS (P<0,05, **Figura 33 A y C**), mientras que no observamos diferencias respecto a MRP3 (**Figura 33B**).

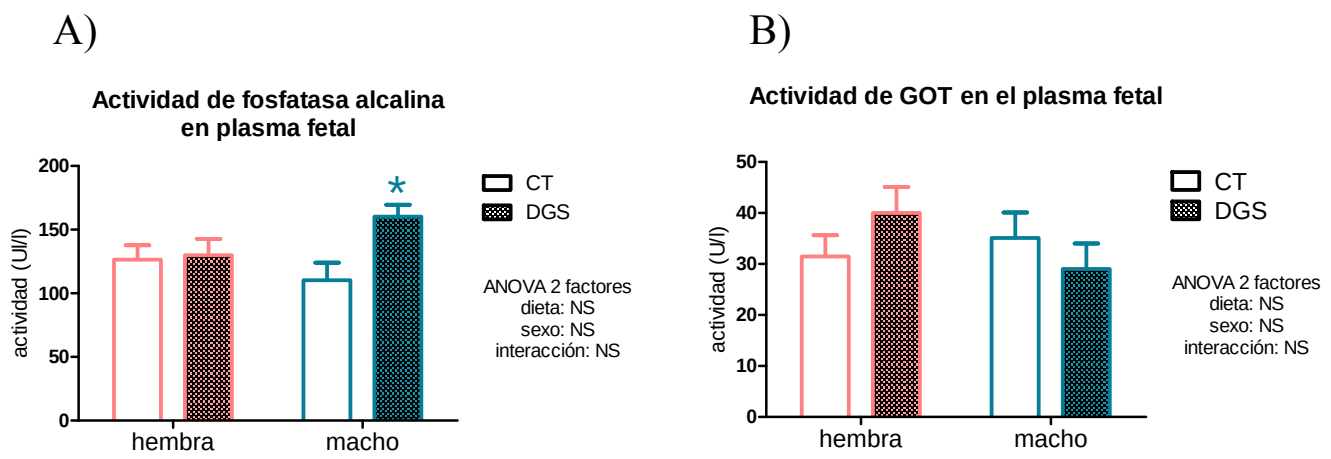
Figura 33: Niveles de ARN mensajero de las proteínas asociadas a resistencia a multidrogas MRP2, MRP3 y MRP4 y del factor de transcripción Nrf2 en hígados de fetos provenientes de ratas del grupo CT y DGS.



Niveles de ARNm (PCR) de A) MRP2, B) MRP3 y C) MRP4 y D) Nrf2 en hígados de fetos de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo CT y DGS. *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Por último, analizamos la actividad plasmática de las enzimas fosfatasa alcalina y glutamato oxalato transaminasa (GOT), parámetros que indican daño y/o disfunción hepática cuando se encuentran incrementados *(Giannini y col. 2005)*. Observamos un aumento de la actividad de fosfatasa alcalina en el plasma de fetos macho del grupo DGS respecto del grupo control (P<0,05, **Figura 34A**), mientras que no encontramos diferencias respecto de la actividad de GOT al comparar los grupos dietarios (**Figura 34B**).

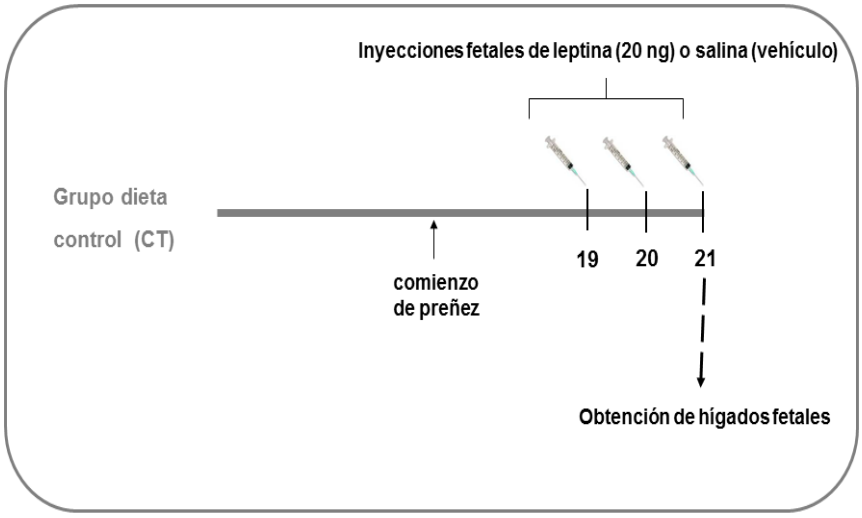
Figura 34: Niveles de actividad de las enzimas plasmáticas fosfatasa alcalina y glutamato oxalato transaminasa (GOT) en el plasma de fetos provenientes de ratas del grupo CT y DGS.



Actividad de fosfatasa alcalina y transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) en el plasma de fetos provenientes de ratas del grupo CT y DGS. *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Parte B: Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre el hígado fetal.

Con el objetivo de poder estudiar los efectos de altos niveles de leptina en el plasma fetal, de manera sostenida y aislado del contexto de hiperlipidemia, sobre el hígado fetal, utilizamos el modelo de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control que describimos en el Capítulo 2. Se realizaron tres inyecciones de 20 ng/ml de leptina los días 19, 20 y 21 de gestación (**Esquema 20**). El día 21 de gestación los fetos inyectados con leptina mostraban altos niveles de la hormona en plasma respecto de los fetos inyectados con el vehículo (Capítulo 2, **Figura 19**). En este día se realizó la eutanasia de las ratas, se obtuvieron los fetos y se explantaron los hígados fetales.

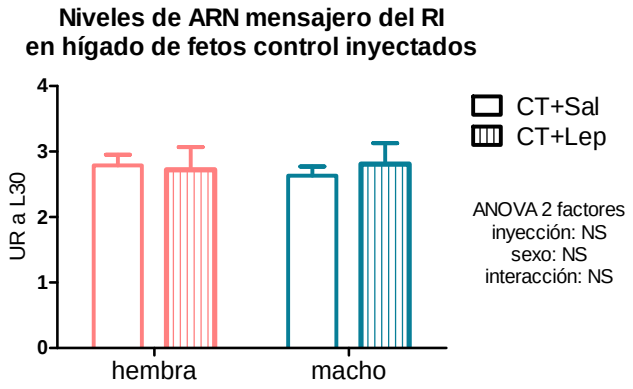


Esquema 20: Modelo experimental para la obtención de hígados provenientes de fetos control inyectados con leptina.

3.B.1. Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre los niveles de ARN mensajero del receptor de insulina en el hígado fetal.

Se analizó la capacidad de la leptina fetal de modular los niveles de ARN mensajero del RI en el hígado fetal. No encontramos diferencias en los niveles de ARN mensajero del RI al comparar los hígados de fetos inyectados con leptina respecto de los inyectados con vehículo (salina) (**Figura 35**).

Figura 35: Niveles de ARN mensajero del receptor de insulina (IR) en hígado de fetos control inyectados con salina (CT+Sal) o con leptina (CT+Lep).

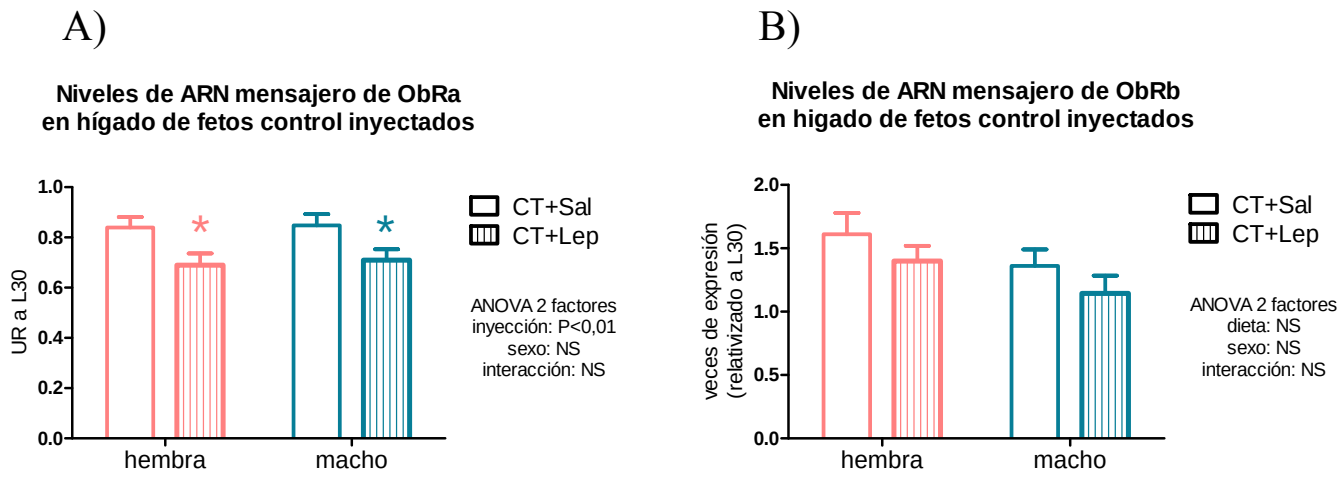


Niveles de ARNm (PCR) del receptor de insulina (IR) en hígados de fetos control inyectados con salina (CT+Sal) o con leptina (CT+Lep). n=6. Todos los fetos provienen de ratas del grupo CT. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

3.B.2. Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre el receptor de leptina en el hígado fetal.

Al estudiar el efecto de la leptina fetal sobre la regulación de su propio receptor (ObR), encontramos que la administración intra-fetal de leptina produjo una disminución de los niveles de ARN mensajero de ObRa ($P<0,05$, **Figura 36A**) y no produjo cambios en los de ObRb (**Figura 36B**). No se observaron diferencias género-dependientes en las mediciones realizadas (**Figura 36**).

Figura 36: Niveles de ARN mensajero de A) la isoforma corta (ObRa) y B) la isoforma larga (ObRb) del receptor de leptina en hígado de fetos control inyectados con salina (CT+Sal) o con leptina (CT+Lep).

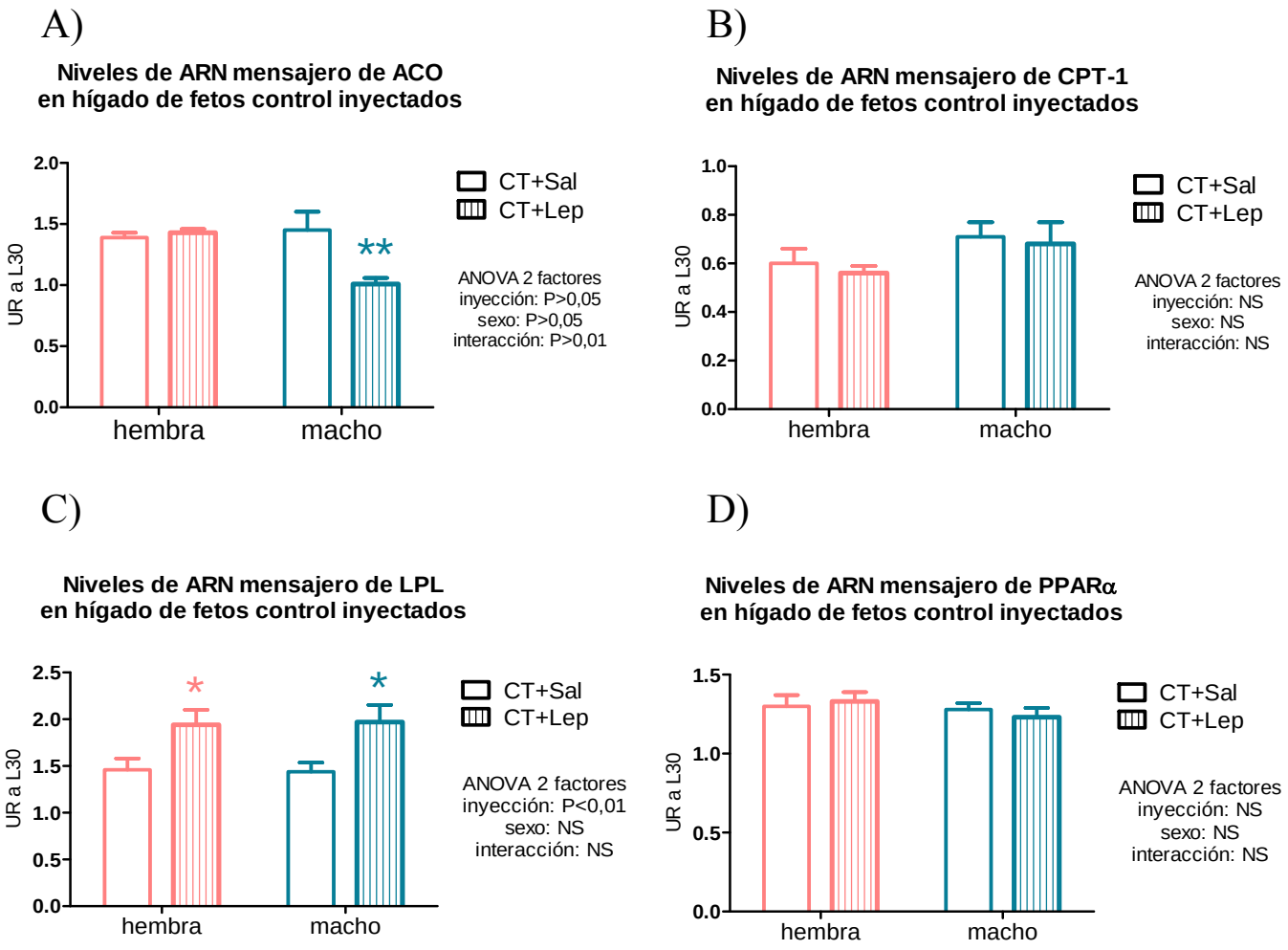


Niveles de ARNm (A: PCR, B: qPCR) de la A) isoforma corta (ObRa) y de B) la isoforma larga (ObRb) del receptor de leptina en hígado de fetos control inyectados con salina (CT+Sal) o con leptina (CT+Lep). n=6. Todos los fetos provienen de ratas del grupo CT. Los resultados de la qPCR fueron analizados mediante el método ΔΔCt. *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

3.B.3. Efecto de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control sobre los niveles de ARN mensajero de ACO, CPT1, LPL y PPARα, genes involucrados en el catabolismo de lípidos.

Las inyecciones intra-fetales con leptina produjeron una disminución de los niveles de ARN mensajero de ACO en hígados de fetos machos (P<0,05, Figura 37A) y un aumento de los niveles de ARN mensajero de LPL en los hígados fetales de ambos sexos (P<0,05, **Figura 37C**). No observamos cambios respecto a los niveles de ARN mensajero de CTP1 ni PPARα en respuesta a las inyecciones (**Figura 37 B y D**).

Figura 37: Niveles de ARN mensajero de ACO, CPT1, LPL y PPARα en hígado de fetos control inyectados con salina (CT+Sal) o con leptina (CT+Lep).



Niveles de ARNm (PCR) de A) ACO, B) CPT1, C) LPL y D) PPARα en hígado de fetos control inyectados con salina (CT+Sal) o con leptina (CT+Lep). Todos los fetos provienen de ratas del grupo CT. *P<0,05, **P<0,01. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Resumen del Capítulo 3

El exceso de grasas saturadas en la dieta materna produjo una sobreacumulación de lípidos en el hígado fetal. Este fenómeno podría estar propiciado por la disminución de enzimas del catabolismo lipídico como ACO y CPT1.

Los hígados del grupo DGS presentaron una elevada producción de óxido nítrico, mayores niveles de peroxidación lipídica y de nitración proteica, parámetros indicadores de estrés oxidativo y nitrativo. Los hígados de fetos hembra del grupo DGS también presentaron una disminución en los niveles de ARN mensajero de enzimas de detoxificación. Este resultado, junto a elevados niveles de actividad de fosfatasa alcalina en el plasma de los fetos hembras provenientes del grupo DGS, indicarían daño tisular y alteraciones en la función de detoxificación.

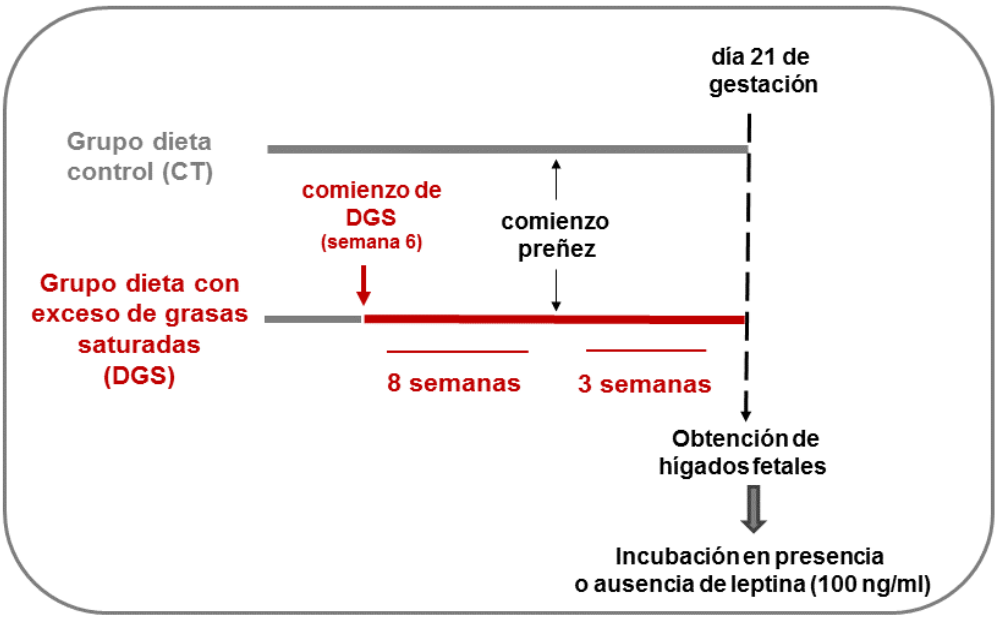
La administración intra-fetal de leptina en fetos provenientes de ratas CT produjo una disminución de los niveles de ARN mensajero de ObRa y un aumento de LPL en el hígado fetal, lo que sugiere un rol de la leptina fetal en la regulación de los niveles de ARN mensajero de estos genes. Sin embargo, en el hígado fetal de las ratas DGS, grupo que presenta altos niveles de leptina circulante, no observamos una disminución de los niveles de ARN mensajero de ObRa ni un aumento de los de LPL. Esto podría deberse a una falta de respuesta a leptina o a que la leptina está ejerciendo su efecto regulatorio sobre ambos genes pero dichos genes se encuentran bajo la regulación de otras vías, lo cual enmascara los efectos de la leptina.

En los hígados fetales del grupo DGS observamos un aumento en los niveles de ARN mensajero y de la proteína de ObR. Estos hígados no sólo se encuentran expuestos a altos niveles de leptina circulante, al igual que los hígados de fetos control inyectados, sino que también se encuentran inmersos en un ambiente hiperlipídico que propiciaría un entorno pro-inflamatorio y pro-oxidante, el cual podría inducir las alteraciones en los niveles de ObR mencionadas.

Capítulo 4: Efecto de leptina sobre el catabolismo de lípidos en el hígado de fetos provenientes de ratas control y de ratas alimentadas con exceso de grasas saturadas

En este trabajo de tesis hemos observado una falta de respuesta a leptina en el hígado fetal del grupo DGS, sugerida porque a pesar de encontrarse inmerso en un ambiente hiperleptinémico, el hígado del grupo DGS no muestra variaciones en los niveles de ARN mensajero de LPL ni de ObRa con respecto al grupo control. Además, observamos también en estos órganos una disminución de los niveles de ARN mensajero de ACO y CPT1, genes regulados por leptina mediante PPARα.

Para comprobar esta hipótesis, los hígados fetales provenientes de ratas del grupo control y del grupo alimentado con una dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) fueron removidos el día 21 de gestación y cultivados en presencia de leptina (100 ng/ml) o en ausencia de la hormona (sin adición: s/a) durante 3 horas en baño metabólico bajo atmósfera controlada. Obtuvimos cuatro grupos de trabajo: 1) hígados fetales provenientes de ratas alimentadas con dieta control y cultivados en ausencia de leptina (CT s/a); 2) hígados fetales provenientes de ratas alimentadas con dieta control y cultivados en presencia de leptina (CT+leptina); 3) hígados fetales provenientes de ratas alimentadas con dieta grasa con exceso de grasas saturadas y cultivados en ausencia de leptina (DGS s/a); 4) hígados fetales provenientes de ratas alimentadas con dieta con exceso de grasas saturadas y cultivados en presencia de leptina (grupo DGS+leptina). El modelo experimental se presenta en el **Esquema 21**.

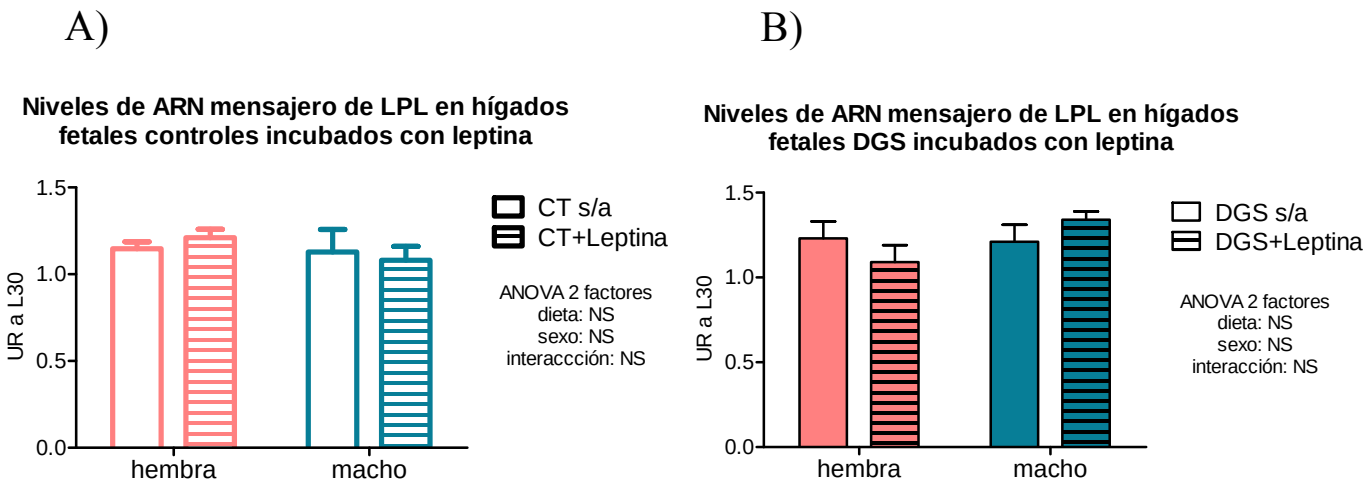


Esquema 21: Modelo experimental para la obtención de explantos fetales provenientes del grupo de ratas control (CT) y de ratas alimentadas con exceso de grasas saturadas (DGS) cultivados en presencia o ausencia de leptina.

4.1. Efectos de leptina sobre la expresión de LPL y del receptor de insulina en cultivo de explantos de hígados fetales.

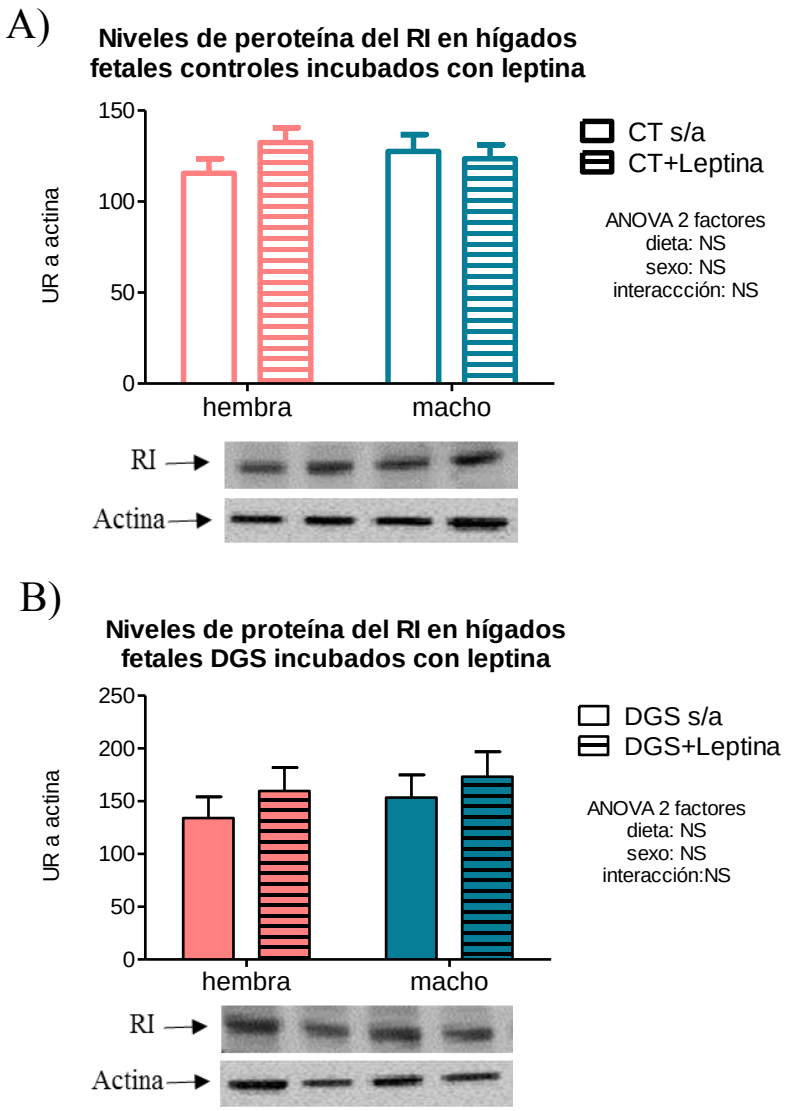
La presencia de leptina no modificó los niveles de ARN mensajero ni de proteína de LPL (**Figura 38**) como tampoco del receptor de insulina (RI) (**Figura 39**) en los explantos de hígados provenientes del grupo DGS y CT. No se observaron diferencias género-dependientes en estos parámetros (**Figuras 38 y 39**).

Figura 38: Niveles de ARN mensajero de LPL en hígados fetales incubados con leptina.



Niveles de ARNm (PCR) de LPL en hígados fetales hembra y macho provenientes de ratas del A) grupo control y B) grupo DGS, cultivados en presencia de 100 ng/ml de leptina (CT+leptina y DGS+leptina) o sin adición de leptina (CT s/a y DGS s/a). n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Figura 39: Niveles de proteína del RI en hígados fetales incubados con leptina.

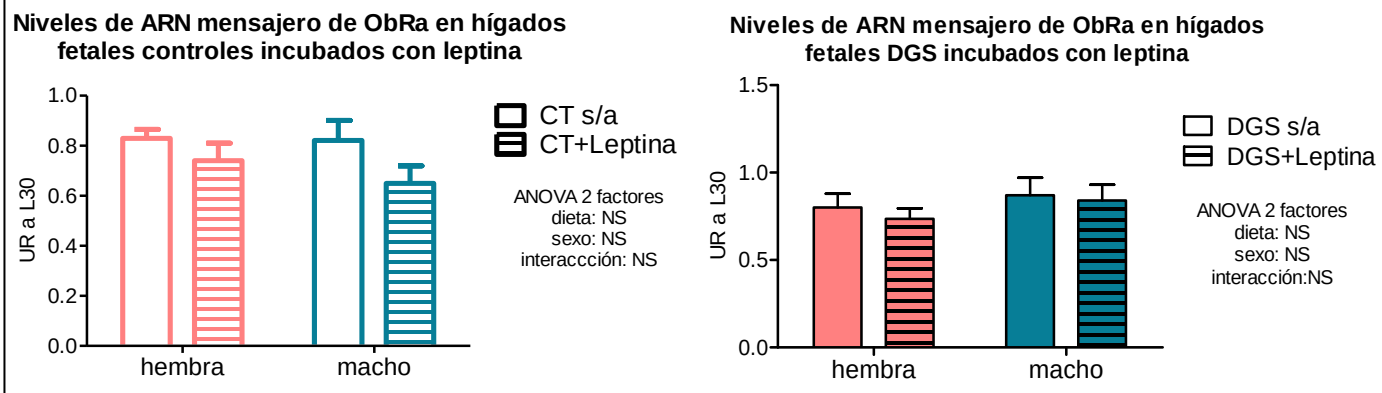


Niveles de proteína (Western blot) de RI en hígados fetales hembra y macho provenientes de ratas del A) grupo control y B) grupo DGS, cultivados en presencia de 100 ng/ml de leptina (CT+leptina y DGS+leptina) o sin adición de leptina (CT s/a y DGS s/a). n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

4.2. Efectos de leptina sobre la expresión del receptor de leptina en cultivo de explantos de hígados fetales.

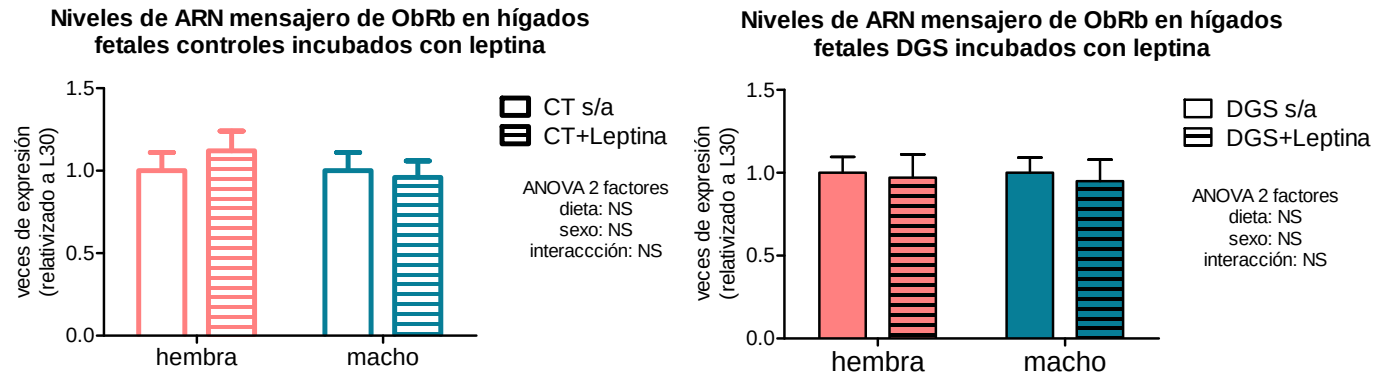
No observamos cambios en los niveles de ARN mensajero de la isoforma corta (ObRa) (**Figura 40**) ni de la isoforma larga (ObRb) (**Figura 41**) del receptor de leptina en los explantos de hígados provenientes del grupo DGS y CT en respuesta al cultivo con leptina. No encontramos diferencias género-dependientes en estos parámetros (**Figuras 40 y 41**).

Figura 40: Niveles de ARN mensajero de ObRa en hígados fetales incubados con leptina.



Niveles de ARNm (PCR) de ObRa en hígados fetales hembra y macho provenientes de ratas del A) grupo control y B) grupo DGS, cultivados en presencia de 100 ng/ml de leptina (CT+leptina y DGS+leptina) o sin adición de leptina (CT s/a y DGS s/a). n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

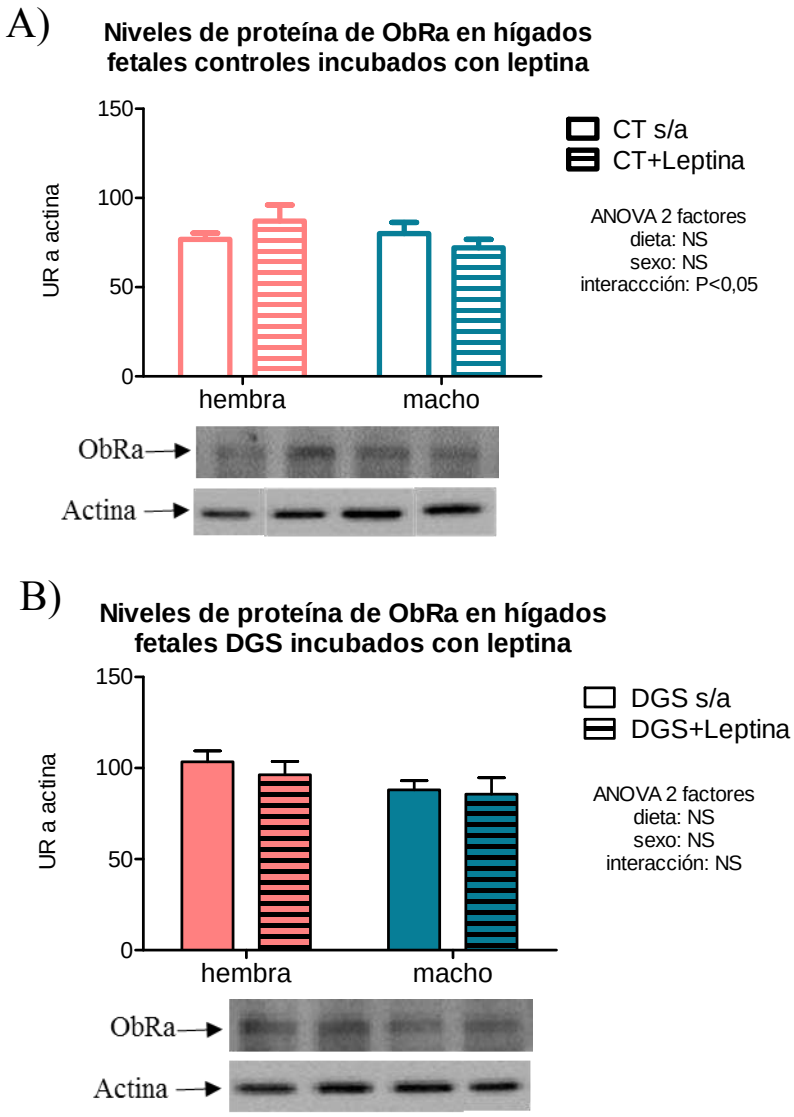
Figura 41: Niveles de ARN mensajero de ObRb en hígados fetales incubados con leptina.



Niveles de ARNm (qPCR) de ObRb en hígados fetales hembra y macho provenientes de ratas del A) grupo control y B) grupo DGS, cultivados en presencia de 100 ng/ml de leptina (CT+leptina y DGS+leptina) o sin adición de leptina (CT s/a y DGS s/a). Los resultados de la qPCR fueron analizados mediante el método ΔΔCt. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

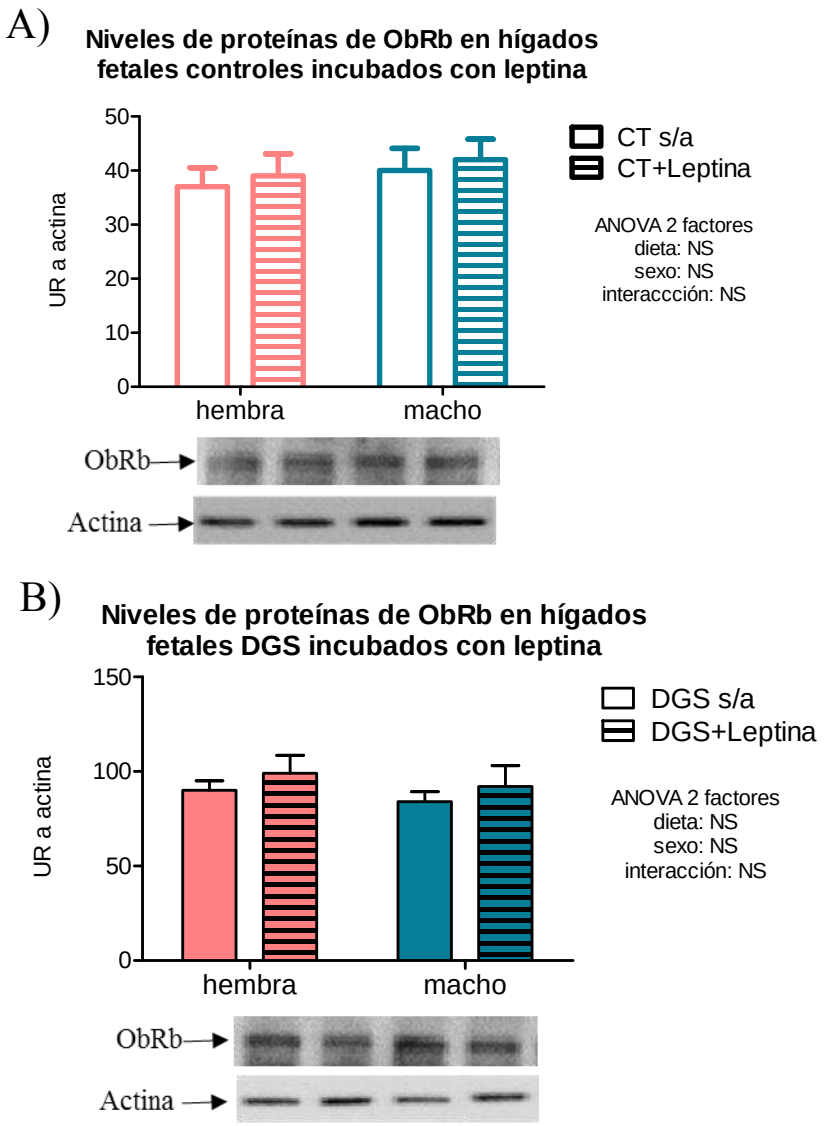
Tampoco observamos cambios en los niveles de proteína de ObRa (**Figura 42**) ni de ObRb (**Figura 43**) en los explantos de hígados provenientes del grupo DGS y CT en respuesta al cultivo con leptina. Una vez más no se observan diferencias género-dependientes (**Figuras 42 y 43**).

Figura 42: Niveles de proteína de ObRa en hígados fetales incubados con leptina.



Niveles de proteína (Western blot) de ObRa en hígados fetales hembra y macho provenientes de ratas del A) grupo control y B) grupo DGS, cultivados en presencia de 100 ng/ml de leptina (CT+leptina y DGS+leptina) o sin adición de leptina (CT s/a y DGS s/a). n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Figura 43: Niveles de proteína de ObRb en hígados fetales incubados con leptina.



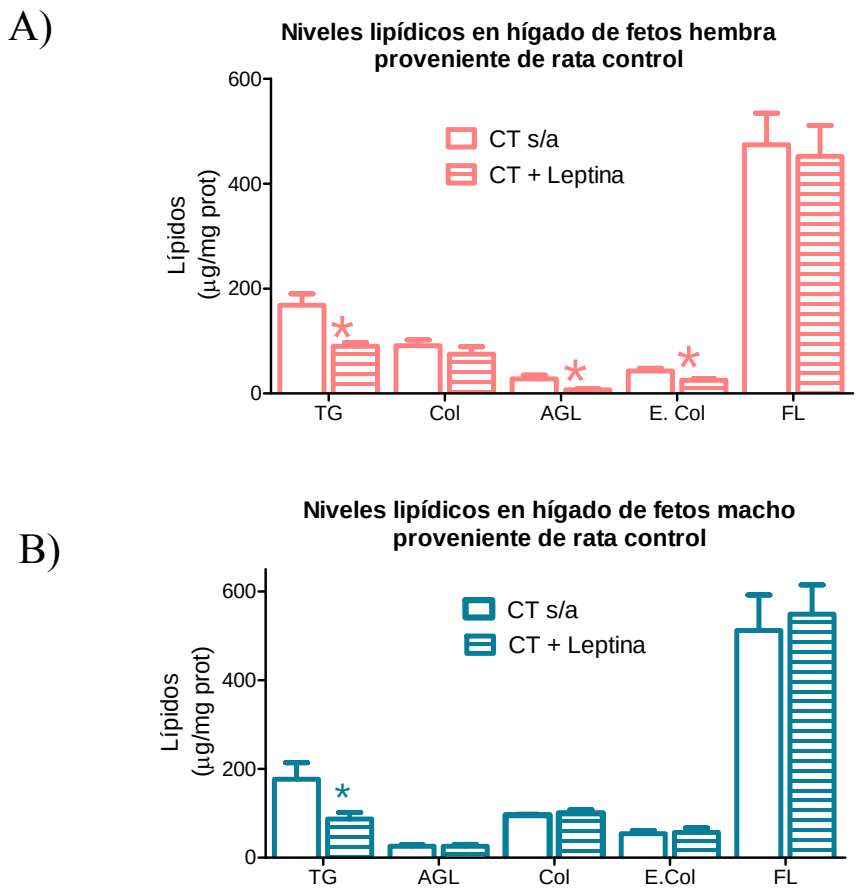
Niveles de proteína (Western blot) de ObRb en hígados fetales hembra y macho provenientes de ratas del A) grupo control y B) grupo DGS, cultivados en presencia de 100 ng/ml de leptina (CT+leptina y DGS+leptina) o sin adición de leptina (CT s/a y DGS s/a). n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

4.3. Efecto de leptina sobre los niveles de lípidos de explantos de hígados fetales.

Al cultivar los hígados fetales del grupo control en presencia de leptina observamos el conocido efecto lipolítico de esta hormona, el cual se tradujo en la disminución de los niveles de triglicéridos tanto en hígado de fetos hembra como macho ($P<0,05$, **Figura 44**). En el caso de las

hembras, también detectamos una disminución de los niveles de ácidos grasos libres y ésteres de colesterol (P<0,05, **Figura 44A**).

Figura 44: Niveles de lípidos en hígados fetales controles incubados con leptina.

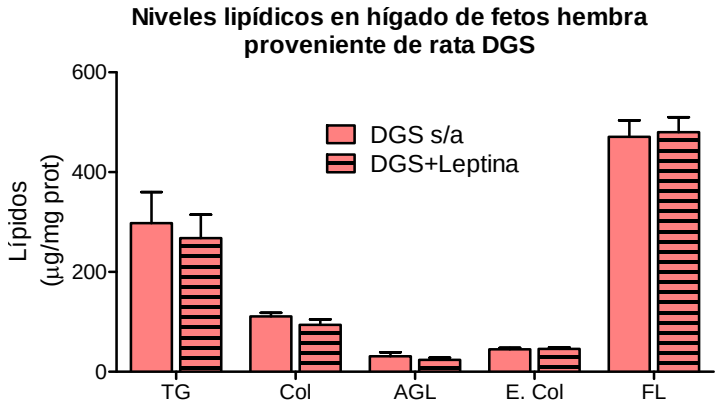


Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en hígados fetales A) hembra y B) macho provenientes de ratas del grupo control cultivados en presencia de 100 ng/ml de leptina (CT+leptina) o sin adición de leptina (CT s/a). *P<0,05. n=6. Test estadístico: t-Student. TG: triglicéridos, Col: colesterol, AGL: ácidos grasos libres, E. Col: ésteres de colesterol, FL: fosfolípidos.

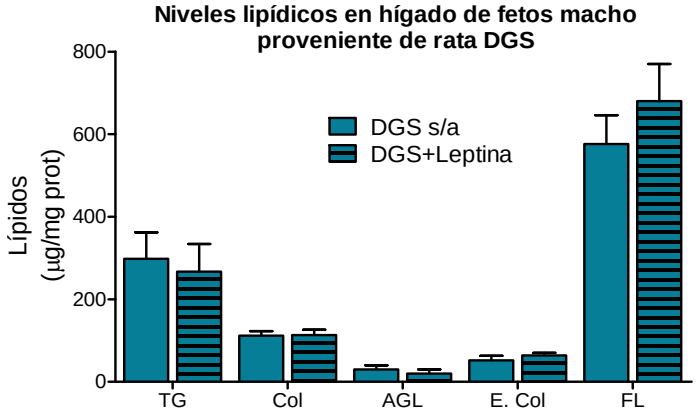
A diferencia de lo observado en el grupo control, no observamos un efecto de la leptina en la modulación de los niveles de lípidos hepáticos en los fetos hembra y macho provenientes del grupo DGS (**Figura 45**).

Figura 45: Niveles de lípidos en hígados fetales del grupo DGS incubados con leptina.

A)



B)



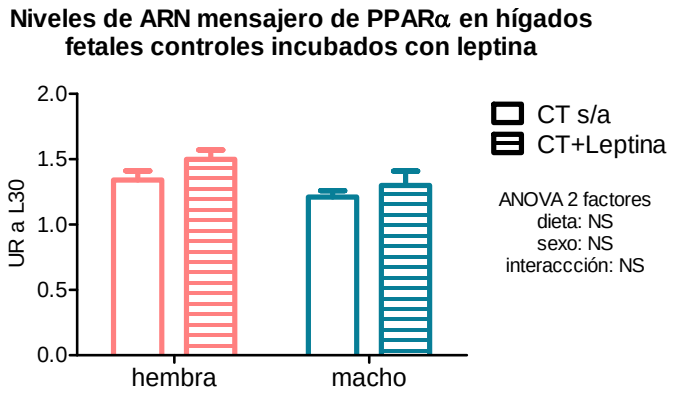
Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en hígados fetales A) hembra y B) macho provenientes de ratas del grupo DGS cultivados en presencia de 100 ng/ml de leptina (DGS+leptina) o sin adición de leptina (DGS s/a). n=6. Test estadístico: t-Student. TG: triglicéridos, Col: colesterol, AGL: ácidos grasos libres, E. Col: ésteres de colesterol, FL: fosfolípidos.

4.4. Efectos de leptina sobre los niveles de ARN mensajero de PPARα, ACO, CPT1 y LPL en cultivo de explantos de hígados fetales.

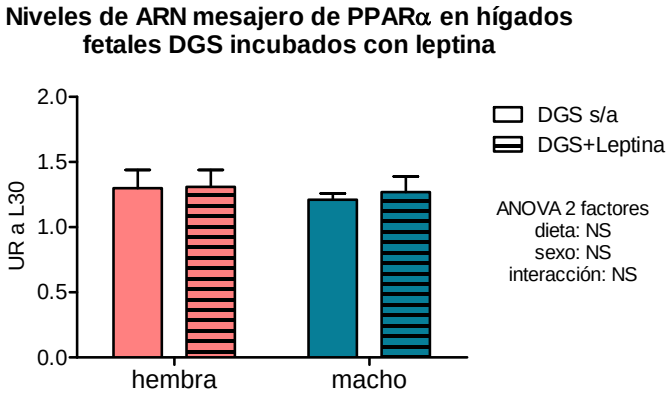
El cultivo con leptina no afectó los niveles de ARN mensajero (**Figura 46**) ni de proteína (**Figura 47**) de PPARα en los hígados fetales del grupo CT como tampoco lo hizo en el grupo DGS. Ninguno de los parámetros analizados presentó diferencias género-dependientes (**Figura 46 y 47**).

Figura 46: Niveles de ARN mensajero de PPARα en hígados fetales incubados con leptina.

A)

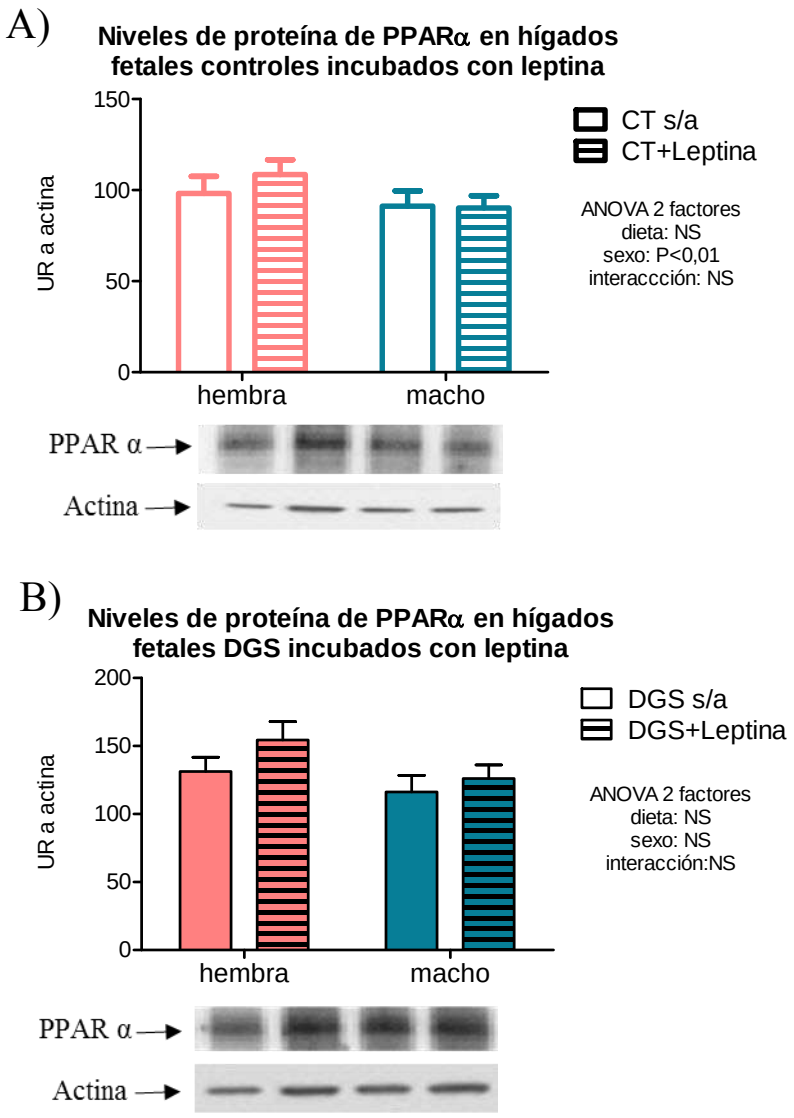


B)



Niveles de ARNm (PCR) de PPARα en hígados fetales hembra y macho provenientes de ratas del A) grupo control y B) grupo DGS, cultivados en presencia de 100 ng/ml de leptina (CT+leptina y DGS+leptina) o sin adición de leptina (CT s/a y DGS s/a). n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

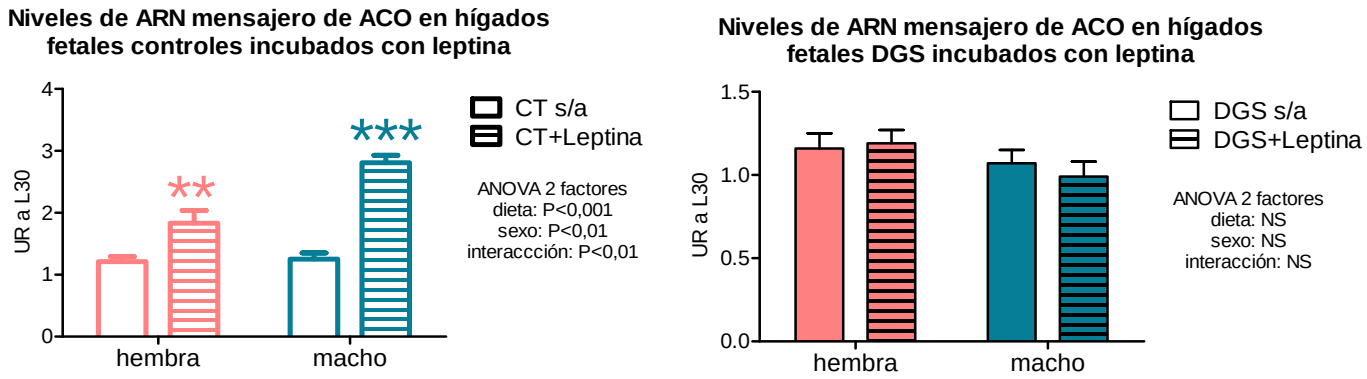
Figura 47: Niveles de proteína de PPARá en hígados fetales incubados con leptina.



Niveles de proteína (Western blot) de PPARα en hígados fetales hembra y macho provenientes de ratas del A) grupo control y B) grupo DGS, cultivados en presencia de 100 ng/ml de leptina (CT+leptina y DGS+leptina) o sin adición de leptina (CT s/a y DGS s/a). n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

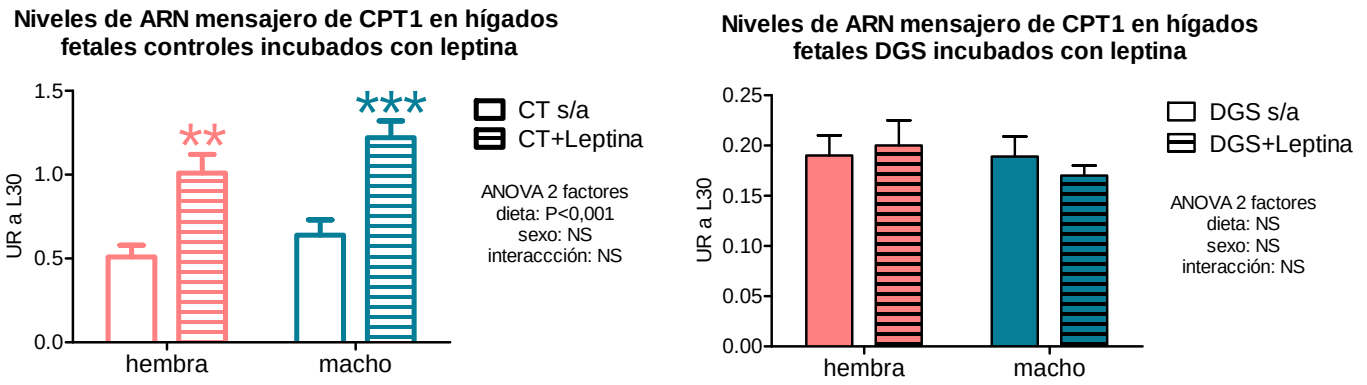
Sin embargo, el cultivo con leptina produjo un aumento en los niveles de ARN mensajero de ACO en los hígados hembra y macho provenientes del grupo control (P<0,05, **Figura 48A**). Este efecto no se observó en los hígados provenientes del grupo DGS (Figura 48B). De igual forma, el cultivo con leptina produjo un aumento de los niveles de ARN mensajero de CPT1 en los hígados hembra y macho provenientes del grupo control (P<0,05, **Figura 49A**) que no se no se observó en los hígados provenientes del grupo DGS (**Figura 49B**).

Figura 48: Niveles de ARN mensajero de ACO en hígados fetales incubados con leptina.



Niveles de ARNm (PCR) de ACO en hígados fetales hembra y macho provenientes de ratas del A) grupo control y B) grupo DGS, cultivados en presencia de 100 ng/ml de leptina (CT+leptina y DGS+leptina) o sin adición de leptina (CT s/a y DGS s/a). n=6. **P<0,01, ***P<0,001. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Figura 49: Niveles de ARN mensajero de CPT1 en hígados fetales incubados con leptina.



Niveles de ARNm (PCR) de CPT1 en hígados fetales hembra y macho provenientes de ratas del A) grupo control y B) grupo DGS, cultivados en presencia de 100 ng/ml de leptina (CT+leptina y DGS+leptina) o sin adición de leptina (CT s/a y DGS s/a). n=6. **P<0,01, ***P<0,001. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

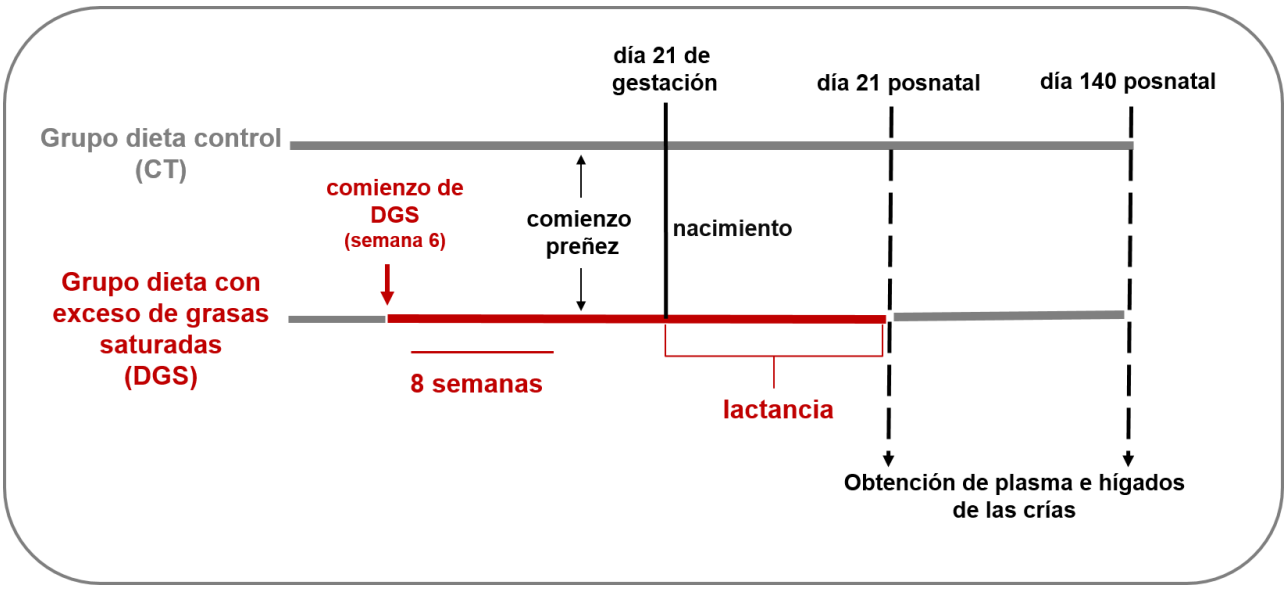
Resumen del Capítulo 4

La expresión de PPARα, LPL y el receptor de leptina no mostró cambios debido al cultivo con leptina ni en los explantos hepáticos controles ni en los provenientes del grupo DGS.

A pesar de esto, el cultivo de los explantos hepáticos de fetos control con leptina produjo una disminución de los triglicéridos tisulares y un aumento de las enzimas lipolíticas ACO y CPT1 hepáticas. Estos efectos lipolíticos de leptina no se observaron en los cultivos de explantos hepáticos de fetos provenientes del grupo DGS, sugiriendo que la dieta materna rica en grasas saturadas induce anomalias en el accionar de la leptina en el hígado fetal.

Capítulo 5: Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre el metabolismo lipídico hepático de crías de 21 y 140 días de edad

Considerando las alteraciones inducidas por la dieta materna con exceso de grasas saturadas en la placenta y el feto, y tras haber evidenciado una falta de respuesta a la leptina en los hígados fetales del grupo DGS, nos resultó de interés estudiar el efecto de dieta grasa materna sobre las crías con el objetivo de evaluar si las alteraciones mencionadas persistían en la progenie en la etapa posnatal. Para ello, permitimos que un grupo de madres del grupo alimentado con exceso de grasas saturadas (DGS) y del grupo control parieran a sus crías. La camada se ajustó a 10 crías. Durante la lactancia se continuó con las dietas correspondientes, y el día del destete, correspondiente al día 21 posnatal, todas las crías fueron separadas de sus madres y alimentadas con dieta control. En el día 21 posnatal se realizó la eutanasia de un grupo de crías, tanto del grupo DGS como del grupo CT. Las crías restantes continuaron su crecimiento hasta el día 140 posnatal, momento en el cual se realizó la eutanasia de los animales de ambos grupos dietarios (**Esquema 22**).



Esquema 22: Modelo experimental para el estudio de la descendencia de rata alimentada con dieta control (CT) o con dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).

Parte A: Crías de 21 días de edad

5.A.1. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre el peso, glucemia, trigliceridemia y colesterolemia en crías de 21 días de edad.

Encontramos mayores niveles de triglicéridos plasmáticos (P<0,05), mayor peso corporal (P<0,05) y mayor peso hepático (P<0,05) en las crías del grupo DGS respecto del grupo control. Los niveles de glucemia y colesterol fueron similares en el plasma de ambos grupos dietarios (**Tabla 14**). No se observaron diferencias género-dependientes en estos parámetros (**Tabla 14**).

		Control	**DGS**	
Glucemia (mg/dL)	Macho	109±6	105±5	ANOVA 2x2 Dieta: NS Sexo: NS Interacción: NS
	Hembra	106±5	106±6	
Trigliceridemia (mg/dL)	Macho	148±13	262±39 *	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,001 Sexo: NS Interacción: NS
	Hembra	127±11	251±31 **	
Colesterolemia (g/dL)	Macho	84±6	83±11	ANOVA 2x2 Dieta: NS Sexo: NS Interacción: NS
	Hembra	88±6	86±11	
Peso corporal (g)	Macho	43.52±0.78	46.48±1.01 *	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,01 Sexo: NS Interacción: NS
	Hembra	42.11±0.74	45.18±0.82 *	
Peso del hígado (g)	Macho	1.68±0.048	1.88±0.069 *	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,001 Sexo: NS Interacción: NS
	Hembra	1.58±0.056	1.83±0.51 *	

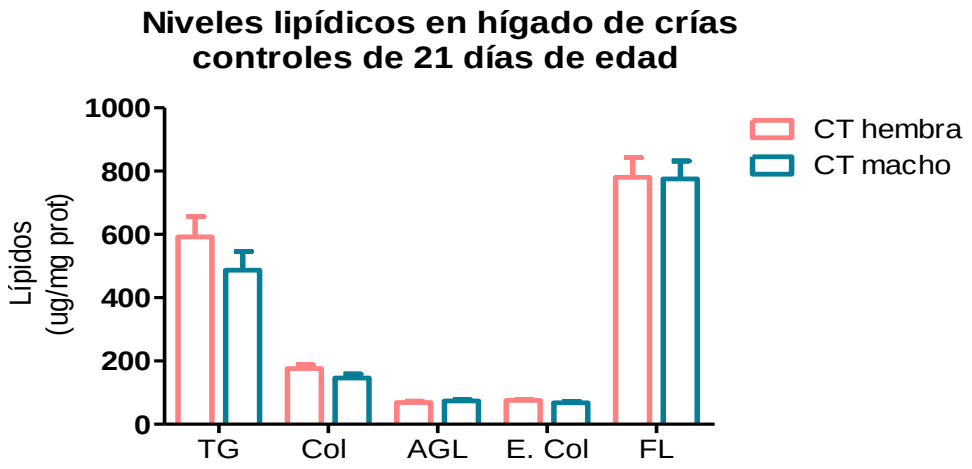
Tabla 14: Niveles plasmáticos de glucemia, trigliceridemia, colesterolemia, y peso corporal y hepático de crías de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). Diferencia estadística entre grupo CT y DGS: *P<0,05, **P<0,01. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

5.A.2. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de lípidos hepáticos en crías de 21 días de edad.

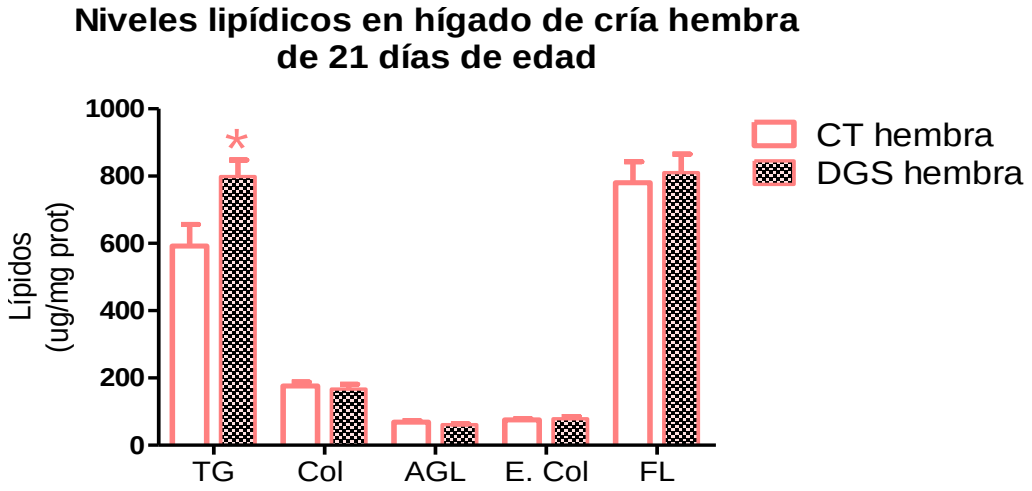
No observamos diferencias al comparar los niveles de las diferentes especies lipídicas en los hígados de crías hembra y macho del grupo control (**Figura 50A**). Al igual que lo observado en el hígado fetal, observamos una sobreacumulación de triglicéridos en el hígado de las crías hembra y macho de 21 días de edad proveniente del grupo DGS en relación al grupo control ($P<0.05$, **Figura 50 B y C**).

Figura 50: Niveles de lípidos en hígados de crías de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).

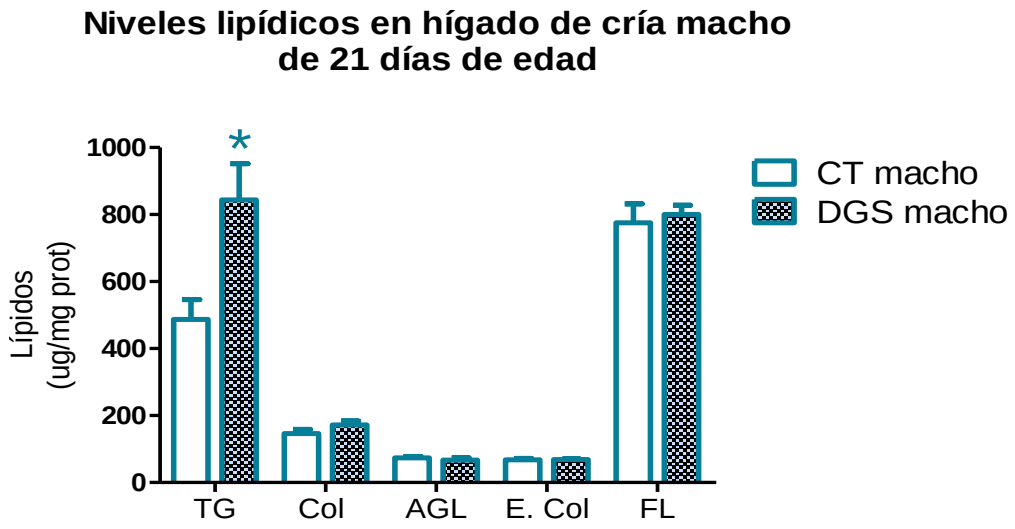
A)



B)



C)



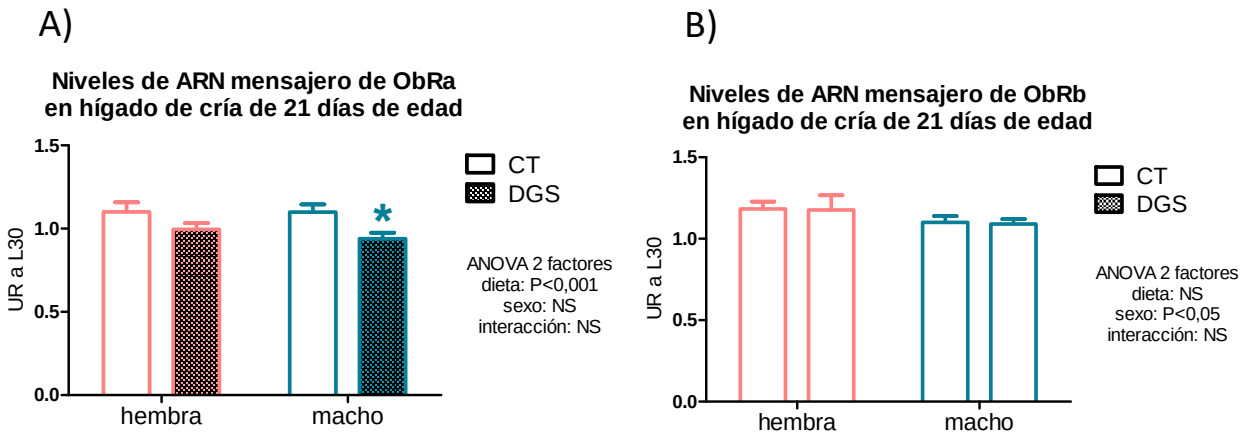
Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en el hígados de crías A) hembra y macho provenientes de ratas del grupo control (CT) y de crías B) hembra y C) macho de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo CT y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). *P<0,05. n=6. Test estadístico: t-Student. TG: triglicéridos, Col: colesterol, AGL: ácidos grasos libres, E. Col: ésteres de colesterol, FL: fosfolípidos.

5.A.3. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de ARN mensajero del receptor de leptina en crías de 21 días de edad.

Conociendo el efecto catabólico de leptina sobre el metabolismo de lípidos, y habiendo detectado sobreacumulación de triglicéridos en el hígado de las crías, nos resultó de interés analizar los niveles de ARN mensajero del receptor de leptina en el hígado de las crías para conocer su potencial accionar. El estudio de los niveles de ARN mensajero en hígados de crías de 21 días de edad mostró una disminución de la isoforma corta del receptor (ObRa) en los machos del grupo DGS (P<0,05, **Figura 51A**). No encontramos diferencias respecto de la isoforma larga del receptor (ObRb) (**Figura 51B**) ni diferencias género-dependientes en ninguna de las dos isoformas analizadas (**Figura 51**).

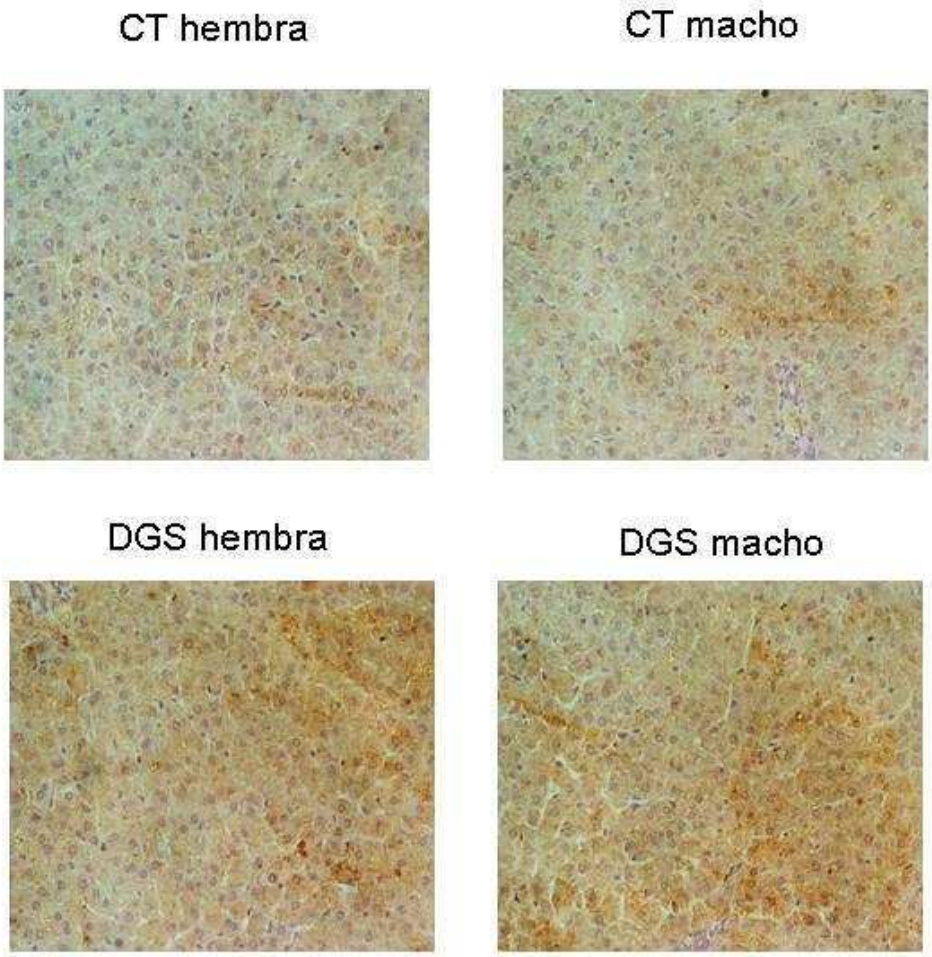
Al estudiar la expresión proteica del receptor total de leptina (ObR) mediante inmunohistoquímica encontramos que ésta se encuentra incrementada en hígados de crías de 21 días de edad provenientes del grupo DGS, sin presentar diferencias género-dependientes (P<0,05, **Figura 52**).

Figura 51: Niveles de ARN mensajero de la isoforma corta (ObRa) y larga (ObRb) del receptor de leptina en hígados de crías de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).



Niveles de ARNm (PCR) de la isoforma A) corta (ObRa) y B) larga (ObRb) del receptor de leptina en hígados de crías de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Figura 52: Niveles de proteína del receptor total de leptina (ObR) en hígados de crías de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).



	CT	DGS
Hembra	360 ± 31,0	731 ± 49 **
Macho	423 ± 59,8	762 ± 79 **

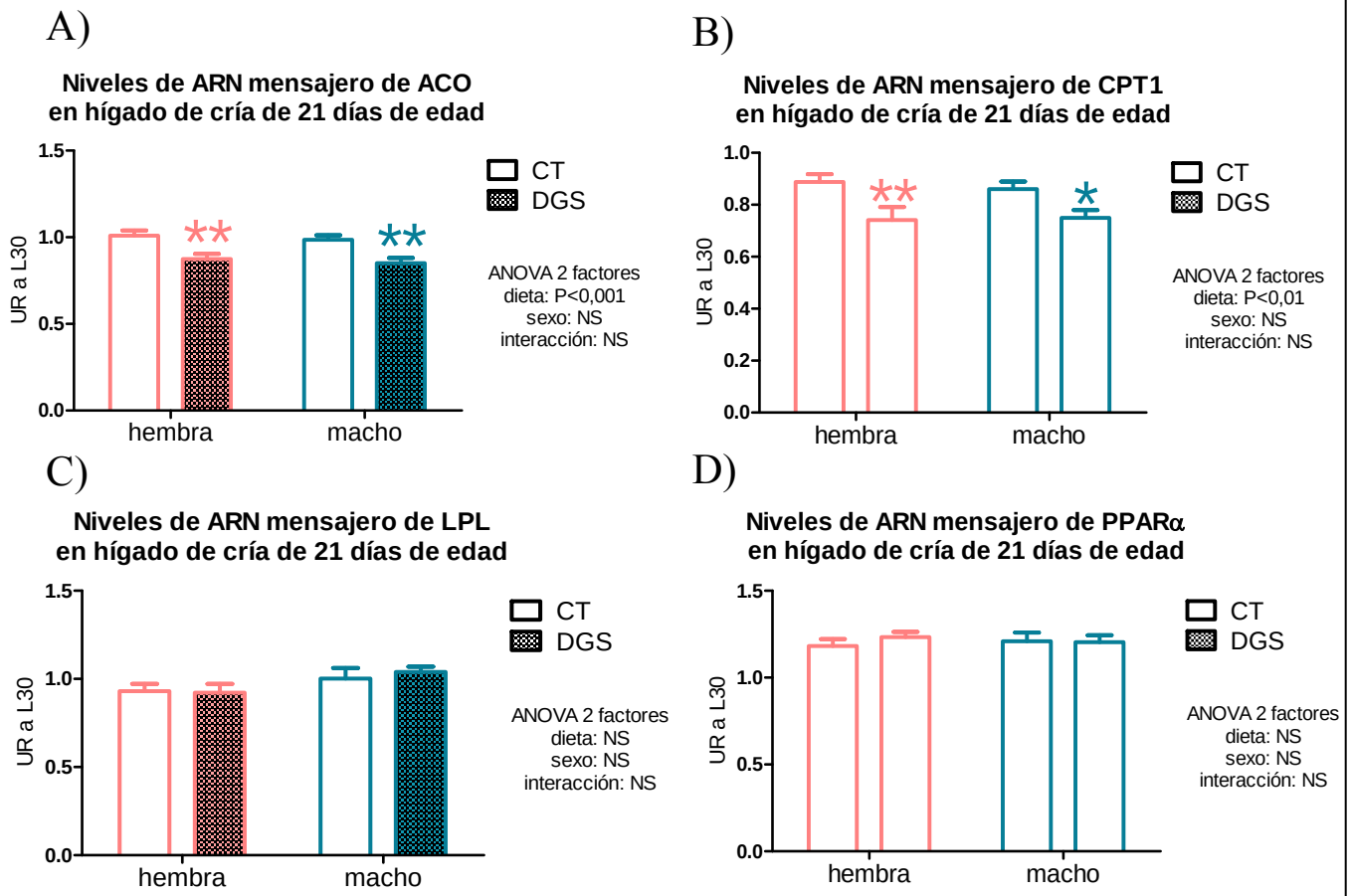
CT negativo

Inmunomarcación representativa (inmunohistoquímica) y cuantificación de los niveles de proteína del receptor total de leptina (ObRb) en hígados de crías de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo CT y DGS. **P<0,01. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

5.A.4. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de ARN mensajero de ACO, CPT1, LPL y PPARα, genes involucrados en el catabolismo de lípidos en el hígado de crías de 21 días de edad.

Al analizar los niveles de ARN mensajero de algunos genes regulados por leptina involucrados en el catabolismo lipídico hepático, encontramos que la dieta materna con exceso de grasas saturadas produjo una disminución de los niveles de ARN mensajero de ACO y CPT1 en los hígados de crías hembra y macho (P<0,05, **Figura 53 A y B**). No observamos diferencias en los niveles de ARN mensajero de LPL ni PPARα entre sexos o grupos dietarios (**Figura 53 C y D**).

Figura 53: Niveles de ARN mensajero de ACO, CPT1, LPL y PPARα en hígados de crías de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).

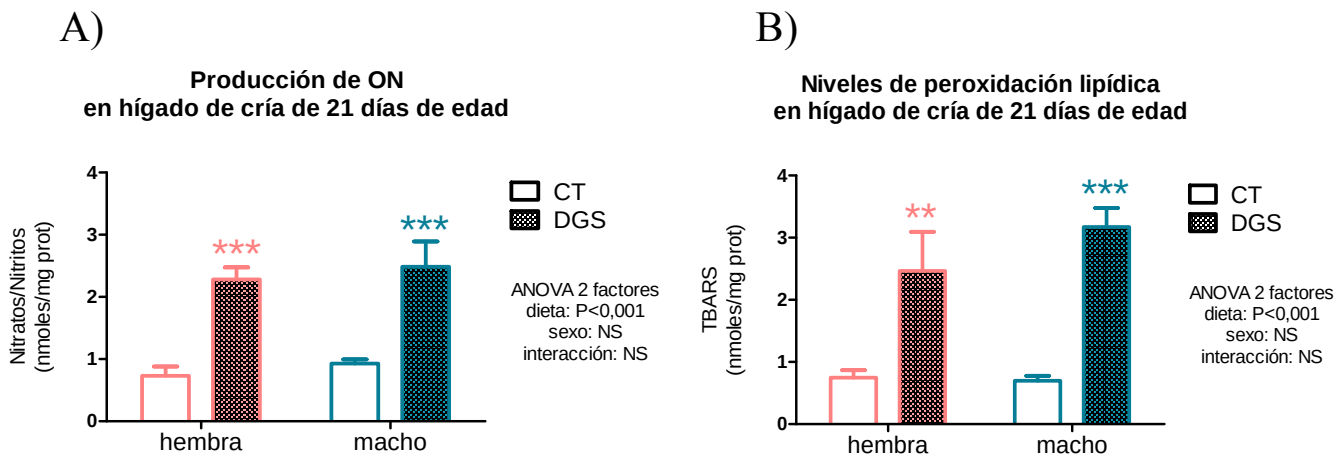


Niveles de ARNm (PCR) de A) ACO, B) CPT1, C) LPL y D) PPARα en hígados de crías de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). *P<0,05, **P<0,01. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

5.A.5. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre indicadores de daño por estrés oxidativo y nitrativo y parámetros de detoxificación hepática en crías de 21 días de edad.

Al igual que lo observado en los hígados fetales del grupo DGS, en el hígado de crías de 21 días de edad del grupo DGS encontramos incrementada la producción de óxido nítrico (P<0,05, **Figura 54A**) y los niveles de peroxidación lipídica (P<0,05, **Figura 54B**) respecto de los hígados del grupo control. Estos parámetros no presentaron diferencias género-dependientes (**Figura 54**).

Figura 54: Producción de óxido nítrico y niveles de peroxidación lipídica en hígados de crías de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo alimentado con dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).



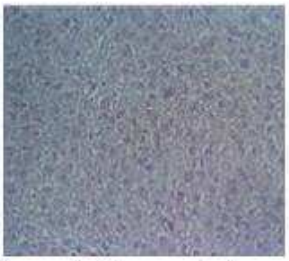
Niveles de producción de óxido nítrico (medición de nitratos/nitritos por ensayo de Griess) y B) niveles de peroxidación lipídica (ensayo de TBARS) en crías de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo CT y DGS. **P<0,01, ***P<0,001. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Los niveles de proteínas nitradas, indicadores de daño tisular debido a estrés oxidativo, se encontraron incrementados en los hígados de las crías del grupo DGS respecto del grupo control, sin mostrar diferencias género-dependientes (P<0.05, **Figura 55**).

Figura 55: Niveles de proteínas nitradas en hígados de crías de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).

	CT	DGS
Hembra	120 ± 11	171 ± 15,2 *
Macho	132 ± 12.9	184 ± 17,8 *

CT negativo

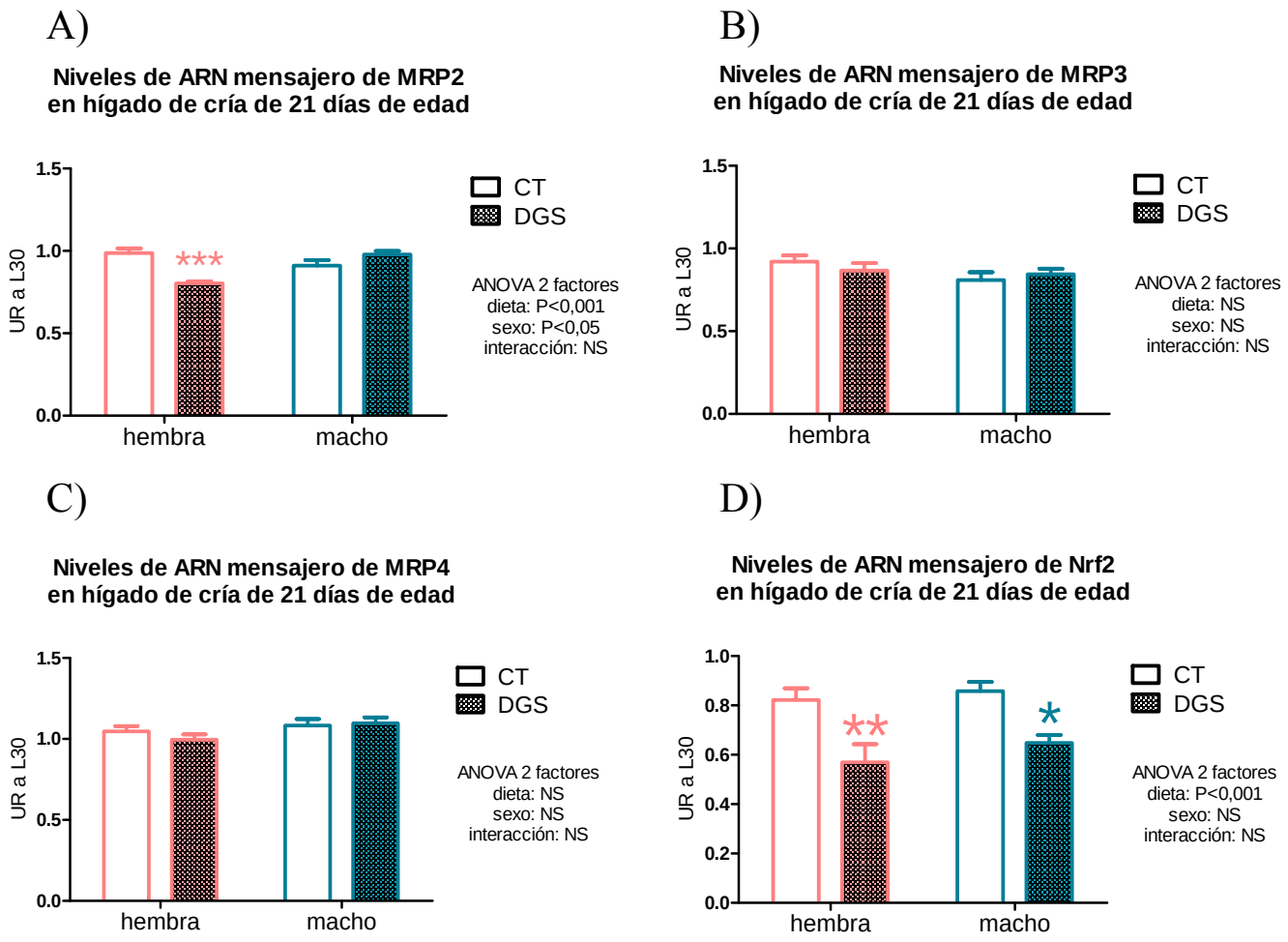


Inmunomarcación representativa (inmunohistoquímica) y cuantificación de proteínas nitradas en tirosina en hígados de crías de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo CT y DGS. Magnificación: 200X. *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Al igual que en el feto, nos interesó evaluar en la cría el efecto de la dieta materna con exceso de grasas saturadas sobre los niveles de ARN mensajero de las MRPs, trasportadores involucrados en la detoxificación hepática. Encontramos una disminución de los niveles de ARN mensajero de MRP2 en el hígado de crías hembra de 21 días de edad del grupo DGS respecto del

grupo control (P<0,001, **Figura 56A**). Asimismo, encontramos que la dieta materna con exceso de grasas saturadas redujo los niveles de ARN mensajero de Nrf2 en el hígado de las crías hembra y macho respecto de lo observado en el grupo control (P<0,05, **Figura 56D**). No observamos diferencias respecto a los niveles de ARN mensajero de MRP3 y MRP4 al comparar el hígado de las crías de los grupos dietarios en estudio como tampoco observamos diferencias género-dependientes en estos parámetros (**Figura 56 B y C**).

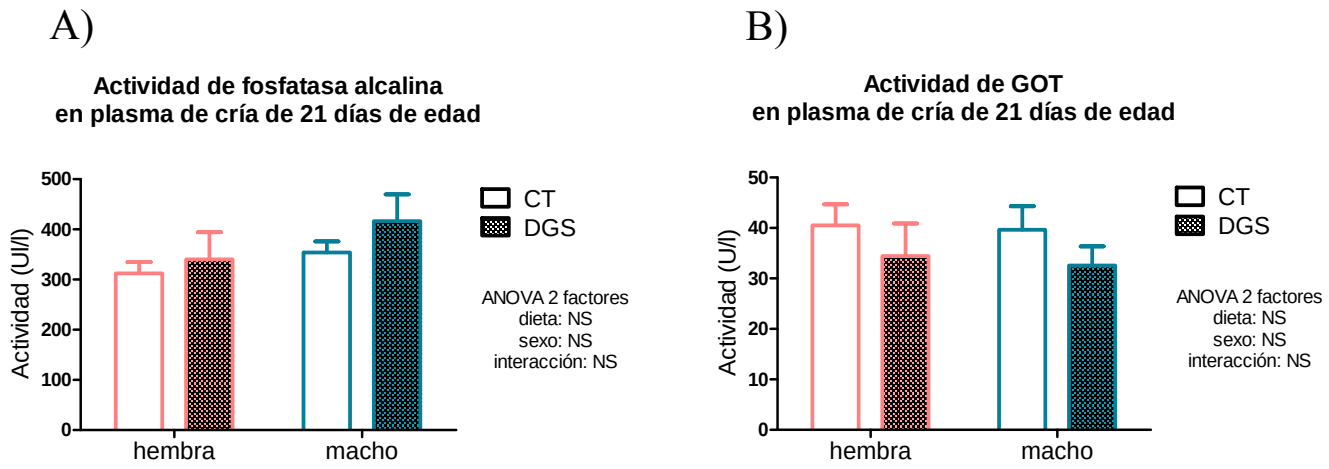
Figura 56: Niveles de ARN mensajero de MRP2, MRP3, MRP4 y Nrf2 en hígados de crías de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).



Niveles de ARNm (PCR) de A) MRP2, B) MRP3, C) MRP4 y D) Nrf2 en hígados de crías de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Por otro lado, no observamos diferencias respecto a la actividad de fosfatasa alcalina ni glutamato oxalato transaminasa en el plasma de las crías provenientes de ratas alimentadas con la dieta con exceso de grasas saturadas respecto de las provenientes del grupo control (**Figura 57**).

Figura 57: Actividad de las enzimas plasmáticas fosfatasa alcalina y glutamato oxalato transaminasa (GOT) en el plasma de crías de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).



Actividad de fosfatasa alcalina y glutamato oxalato transaminasa (GOT) en el plasma de crías de 21 días de edad provenientes de ratas del grupo CT y DGS. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Parte B: Crías de 140 días de edad.

5.B.1. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre el peso, glucemia, trigliceridemia y colesterolemia en crías de 140 días de edad.

No encontramos diferencias en los valores de glucemia, trigliceridemia y colesterolemia en las crías de 140 días de edad del grupo DGS respecto al grupo control. Tampoco observamos cambios en el peso corporal y hepático debido a la dieta materna. Tanto en el grupo control como en el grupo DGS observamos un mayor peso corporal (P<0,05) y hepático (P<0,05) en machos respecto a las hembras (**Tabla 15**).

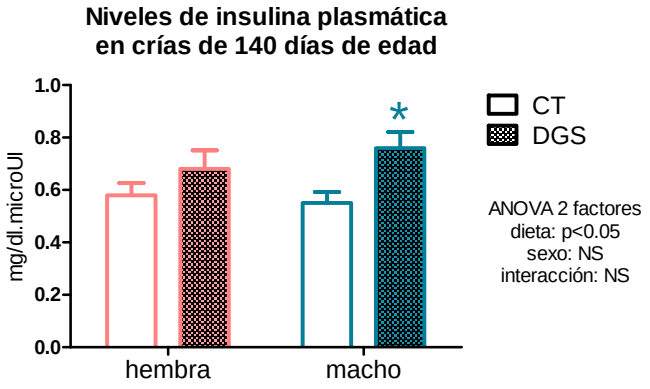
		Control	DGS	
Glucemia (mg/dL)	Macho	100±4	93±3	ANOVA 2x2 Dieta: NS Sexo: NS Interacción: NS
	Hembra	100±3	104±6	
Trigliceridemia (mg/dL)	Macho	128±9	125±12	ANOVA 2x2 Dieta: NS Sexo: NS Interacción: NS
	Hembra	113±9	109±9	
Colesterolemia (g/dL)	Macho	93±3	85±5	ANOVA 2x2 Dieta: NS Sexo: NS Interacción: NS
	Hembra	91±7	80±6	
Peso corporal (gr.)	Macho	555±19	606±19	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,01 Sexo: P<0,001 Interacción: NS
	Hembra	327±11 ##	352±12 ##	
Peso del hígado (gr.)	Macho	15.64±0.43	16.39±0.61	ANOVA 2x2 Dieta: NS Sexo: P<0,001 Interacción: NS
	Hembra	10.14±0.15 #	11.22±0.29 #	

Tabla 15: Niveles plasmáticos de glucemia, trigliceridemia, colesterolemia, y peso corporal y hepático de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). #P<0,05, ##P<0,01 al comparar hembra vs macho dentro del mismo grupo dietario. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

5.B.2. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la insulinemia y la resistencia a la insulina en crías de 140 días de edad.

Al estudiar los niveles plasmáticos de insulina, encontramos un aumento de esta hormona en las crías macho del grupo DGS al comparar con el grupo CT (P<0,05, **Figura 58**). No observamos diferencias género-dependientes dentro del grupo control (**Figura 58**).

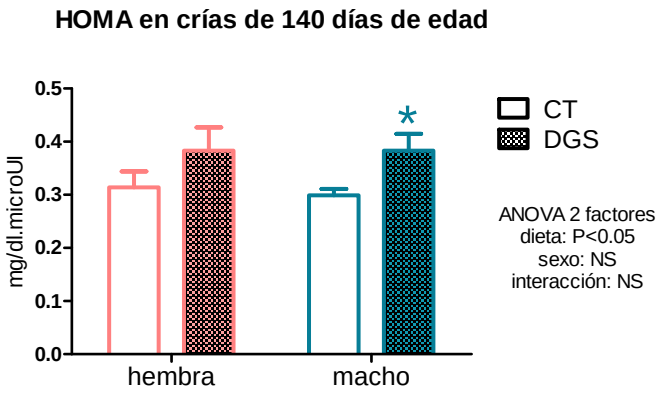
Figura 58: Niveles plasmáticos de insulina en crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).



Niveles plasmátios de insulina en crías hembra y macho de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Al calcular el HOMA, encontramos un incremento de este índice en las crías macho del grupo DGS en relación al grupo control (P<0,05, **Figura 59**). En el caso de las hembras, si bien se observó una tendencia hacia el aumento en este parámetro, no se evidenciaron diferencias significativas (**Figura 59**).

Figura 59: Índice HOMA en en crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).



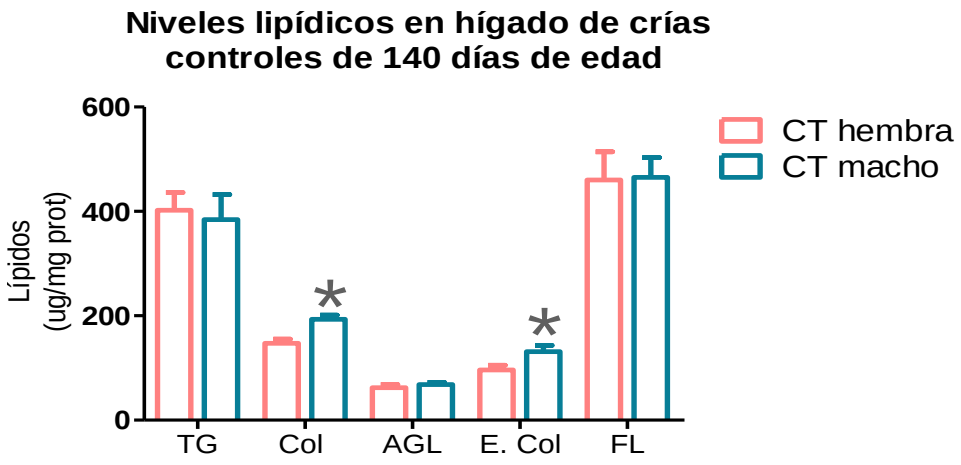
Índice HOMA en crías hembra y macho de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

5.B.3. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de lípidos hepáticos en crías de 140 días de edad.

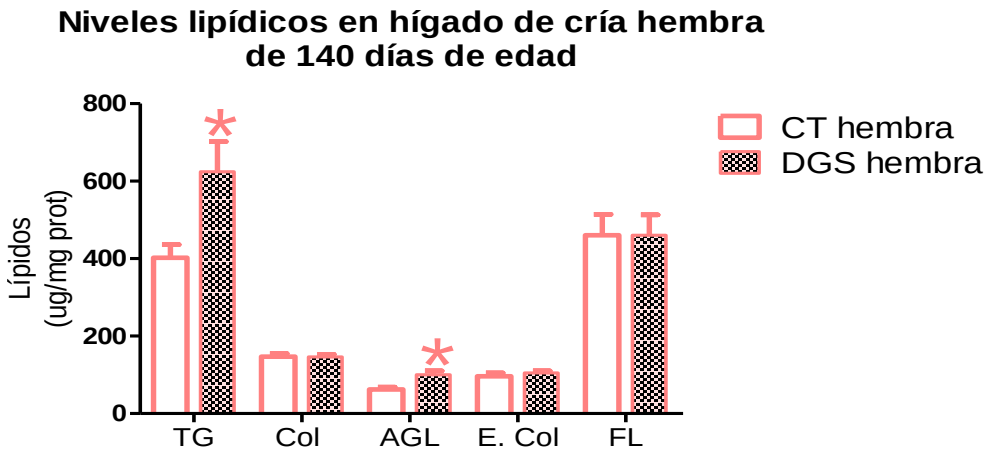
Dentro del grupo CT observamos mayores niveles de colesterol y ésteres de colesterol en el hígado de crías macho respecto del de crías hembra (P<0,05, **Figura 60A**). Al igual que lo observado en el hígado fetal y en las crías de 21 días de edad, observamos una sobreacumulación de triglicéridos en el hígado de las crías tanto hembra como macho de 140 días de edad provenientes del grupo de ratas alimentadas con un exceso de grasas saturadas (DGS) en relación al grupo control (P<0,05, **Figura 60 B y C**). Además, observamos una sobreacumulación de ácidos grasos libres (AGL) en el hígado de crías hembra del grupo DGS respecto del grupo CT (P<0,05, **Figura 60B**).

Figura 60: Niveles de lípidos en hígados de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).

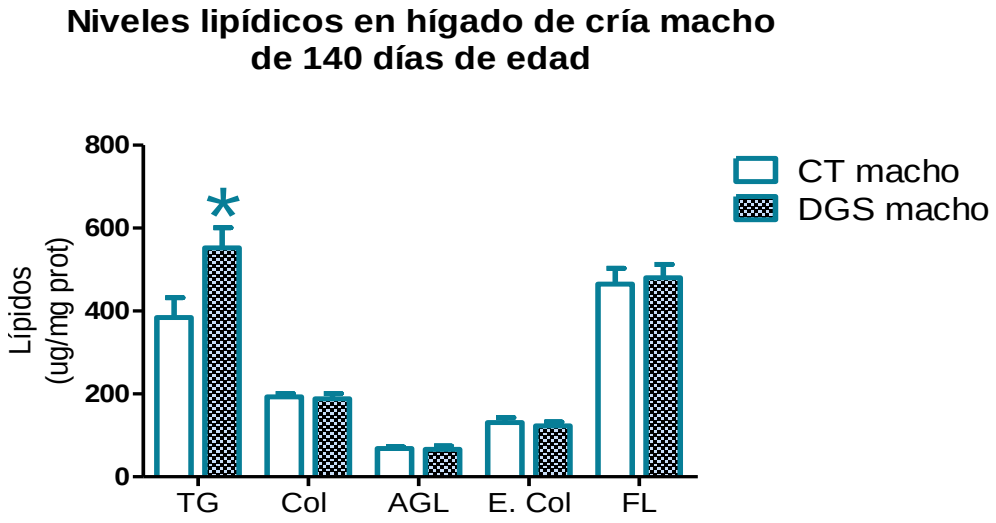
A)



B)



C)

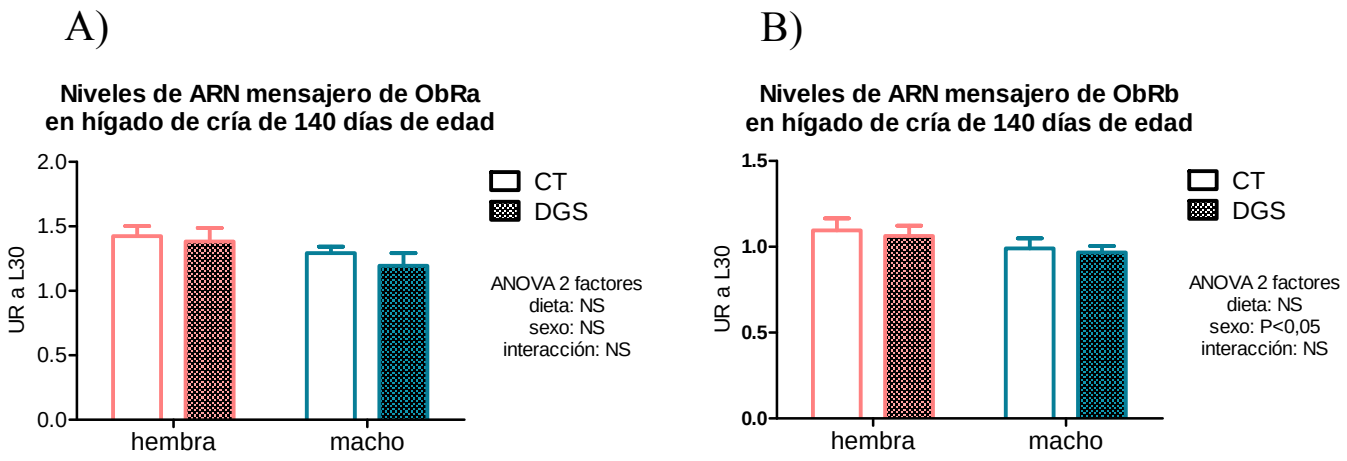


Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en el hígado de fetos A) hembra y macho provenientes de ratas del grupo control (CT) y en el hígado de fetos B) hembra y C) macho de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).*P<0,05. n=6. Test estadístico: t-Student. TG: triglicéridos, Col: colesterol, AGL: ácidos grasos libres, E. Col: ésteres de colesterol, FL: fosfolípidos.

5.B.4. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre la expresión del receptor de leptina en crías de 140 días de edad.

En los hígados de crías adultas de 140 días de edad no encontramos diferencias en los niveles de ARN mensajero hepáticos de ObRa ni ObRb al comparar los grupos dietarios estudiados (Figura 61). Tampoco encontramos diferencias género-dependientes en este estudio (Figura 61).

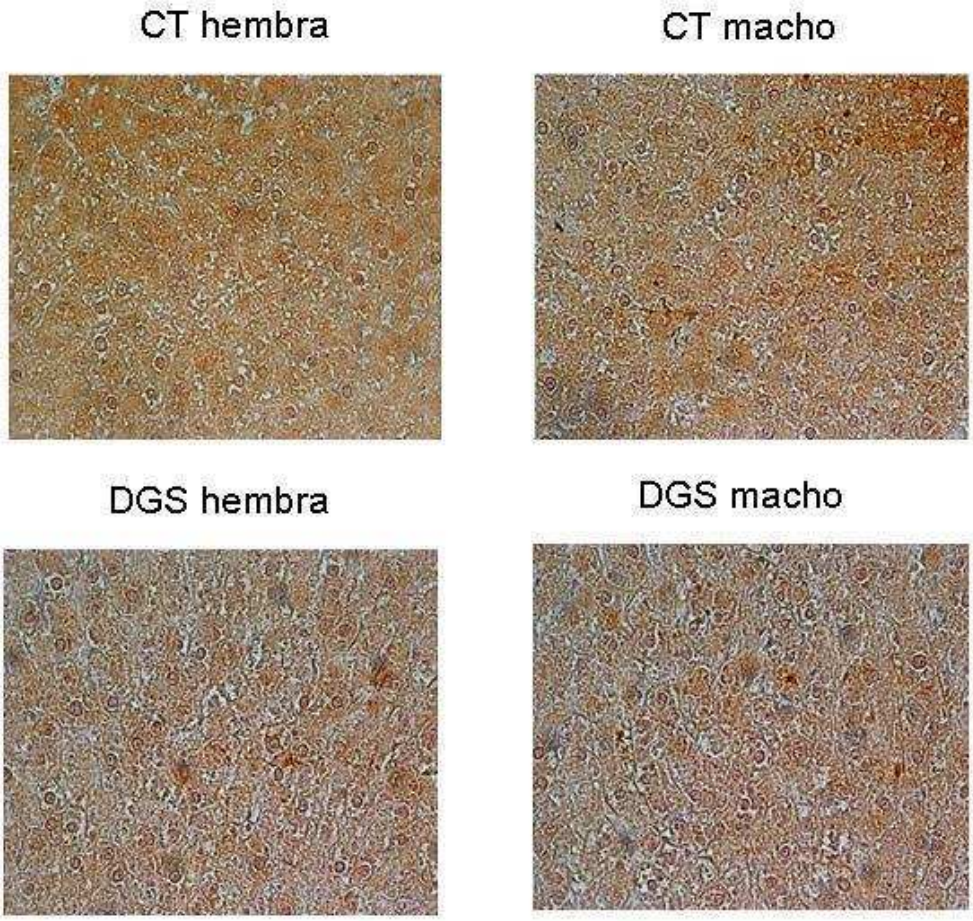
Figura 61: Niveles de ARN mensajero de la isoforma corta (ObRa) y larga (ObRb) del receptor de leptina en hígados de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).



Niveles de ARNm (PCR) de la isoforma A) corta (ObRa) y B) larga (ObRb) del receptor de leptina en hígados de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

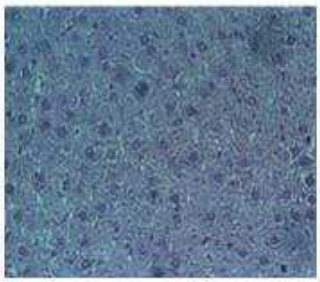
Al estudiar la expresión proteica del receptor total de leptina (ObR) mediante inmunohistoquímica, encontramos que la dieta grasa materna indujo una disminución de la expresión de ObR en el hígado de crías de 140 días de edad, sin observarse diferencias género-dependientes dentro del grupo control ($P<0,05$, **Figura 62**).

Figura 62: Niveles de proteína del receptor total de leptina (ObR) en hígados de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).



	CT	DGS
Hembra	288 ± 309	171 ± 32 *
Macho	268 ± 507	104 ± 26 *

CT negativo

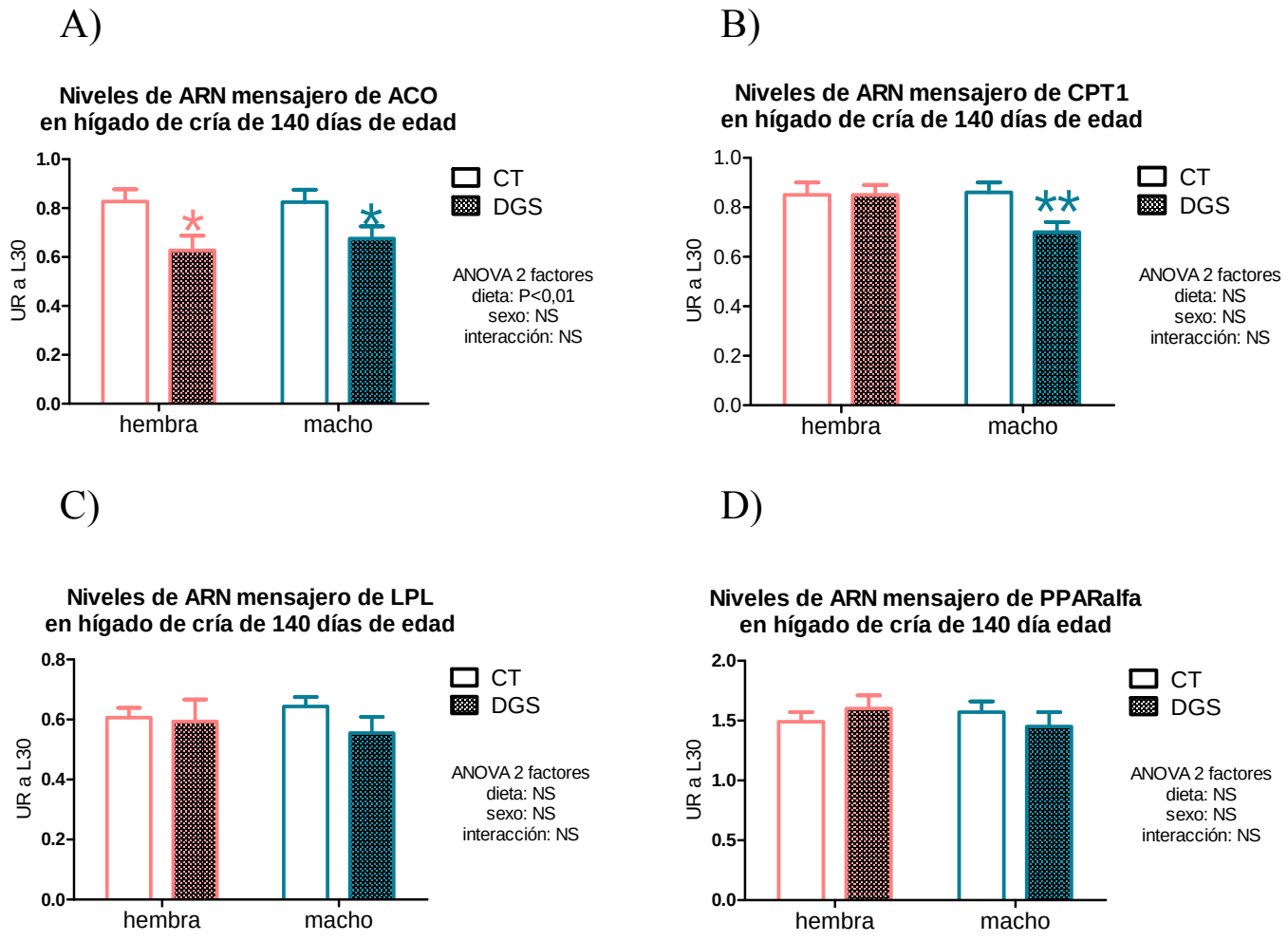


Inmunomarcación representativa (inmunohistoquímica) y cuantificación de los niveles de proteína el receptor total de leptina (ObRb) en hígados de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo CT y DGS. *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

5.B.5. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre los niveles de ARN mensajero de ACO, CPT1, LPL y PPARα, genes involucrados en el catabolismo de lípidos, en crías de 140 días de edad.

De manera similar a lo observado en las crías de 21 días de edad, encontramos que la dieta materna con exceso de grasas saturadas (DGS) produjo una disminución de los niveles de ARN mensajero de ACO en los hígados de crías hembra y macho ($P<0,05$, **Figura 63A**) y una disminución de CPT1 en los hígados de crías macho ($P<0,01$, **Figura 63B**), en relación al control. No observamos diferencias en los niveles de ARN mensajero de LPL ni de PPARα al comparar los hígados de las crías provenientes de los grupos dietarios en estudio (**Figura 63 C y D**).

Figura 63: Niveles de ARN mensajero de, ACO, CPT1, LPL y PPARα en hígados de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).

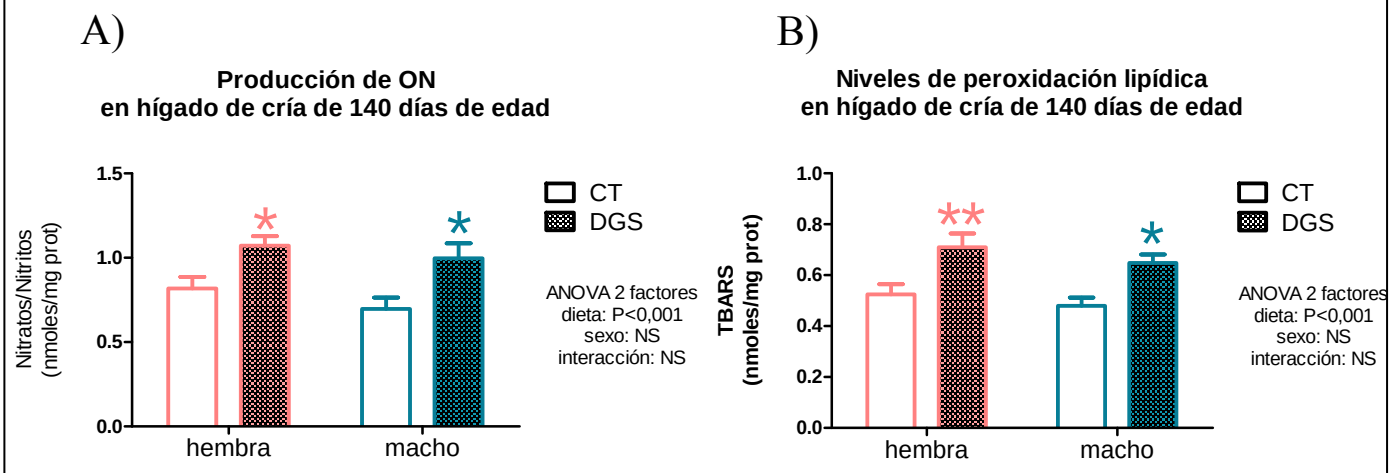


Niveles de ARNm (PCR) de A) ACO, B) CPT1, C) LPL y D) PPARα en hígados de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). *P<0,05, **P<0,01. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

5.B.6. Efectos del exceso de grasas saturadas en la dieta materna sobre indicadores de daño por estrés oxidativo y nitrativo y parámetros de detoxificación hepática en crías de 140 días de edad.

Al igual que lo observado en los hígados de crías de 21 días de edad del grupo DGS, encontramos incrementada la producción de óxido nítrico y los niveles de peroxidación lipídica en los hígados de crías hembra y macho de 140 días de edad del grupo DGS respecto del grupo control (P<0,05, **Figura 64**).

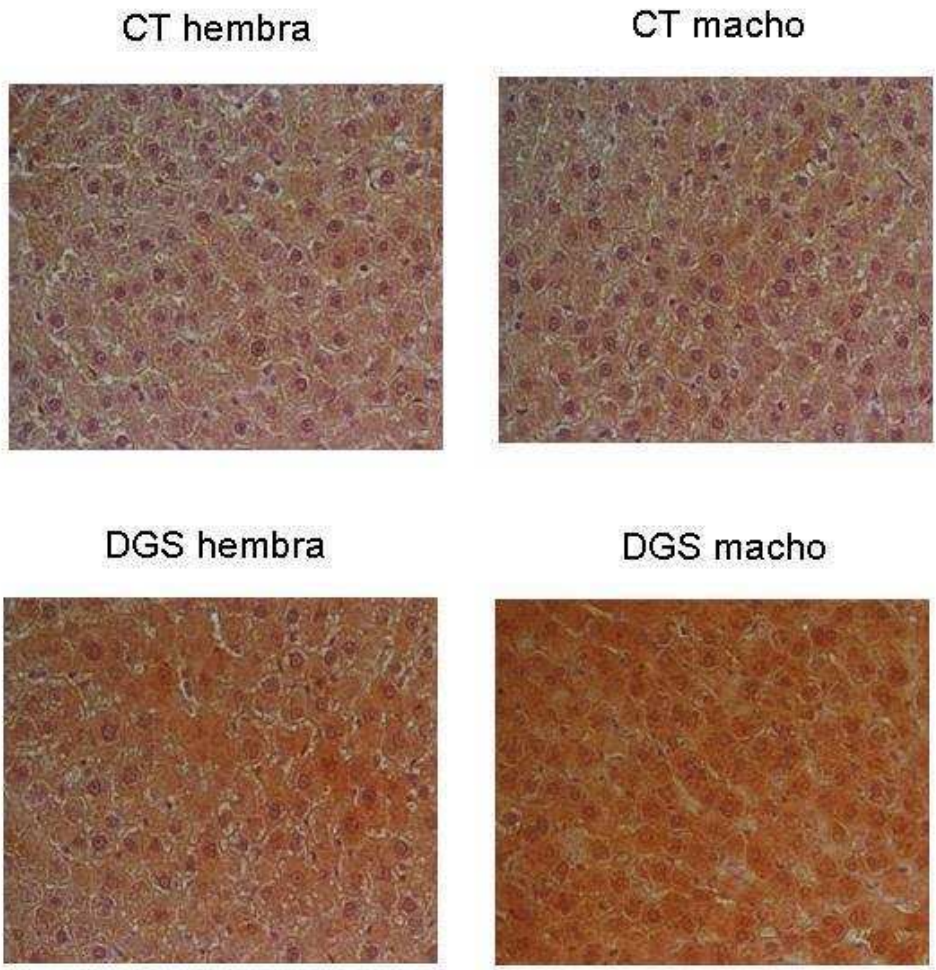
Figura 64: Producción de óxido nítrico y niveles de peroxidación lipídica en hígados de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo alimentado con dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).



Niveles de producción de óxido nítrico (medición de nitratos/nitritos por ensayo de Griess) y B) niveles de peroxidación lipídica (ensayo de TBARS) en crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo CT y DGS. *P<0,05, **P<0,01. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Los niveles de proteínas nitradas, indicadores de daño tisular debido a estrés oxidativo, también se encontraron incrementados en los hígados de las crías hembra y macho del grupo DGS respecto del grupo control (P<0,05, **Figura 65**).

Figura 65: Niveles de proteínas nitradas en hígados de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).



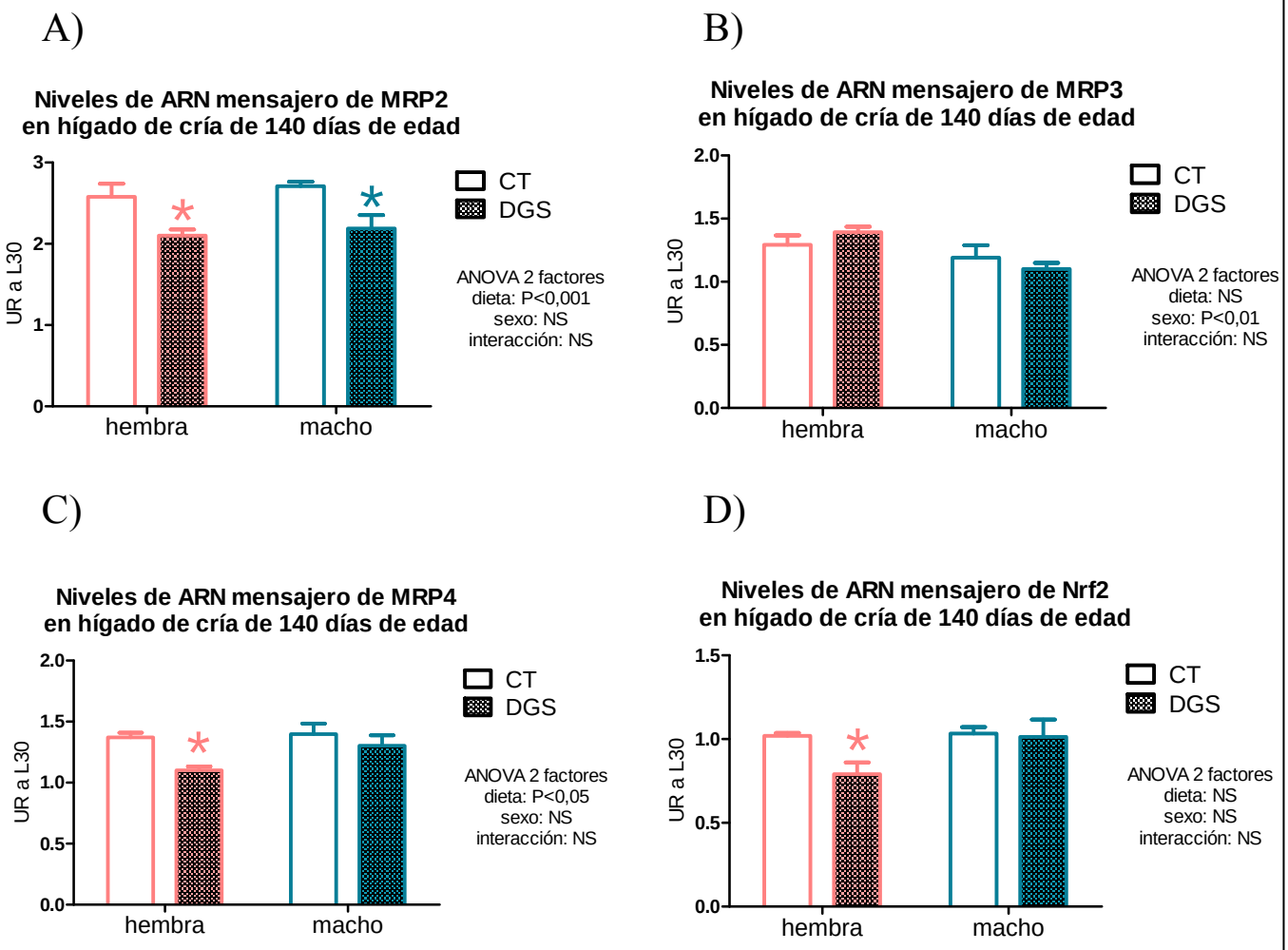
	CT	DGS
Hembra	110 ± 13,4	163 ± 16,7 *
Macho	125 ± 10,3	192 ± 19,5 *

CT negativo

Inmunomarcación representativa (inmunohistoquímica) y cuantificación de proteínas nitradas en tirosina en hígados de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo CT y DGS. Magnificación: 200X. *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Al estudiar las MRPs, observamos una disminución de los niveles de ARN mensajero de MRP2 en el hígado de crías hembra y machos provenientes del grupo DGS en relación al grupo control (P<0,05, **Figura 66A**). En el hígado de las hembras del grupo DGS también observamos una disminución de MRP4 y Nrf2 (P<0,05, **Figura 66 C y D**). No observamos diferencias respecto a MRP3 en el hígado entre los grupos dietarios estudiados (**Figura 66B**).

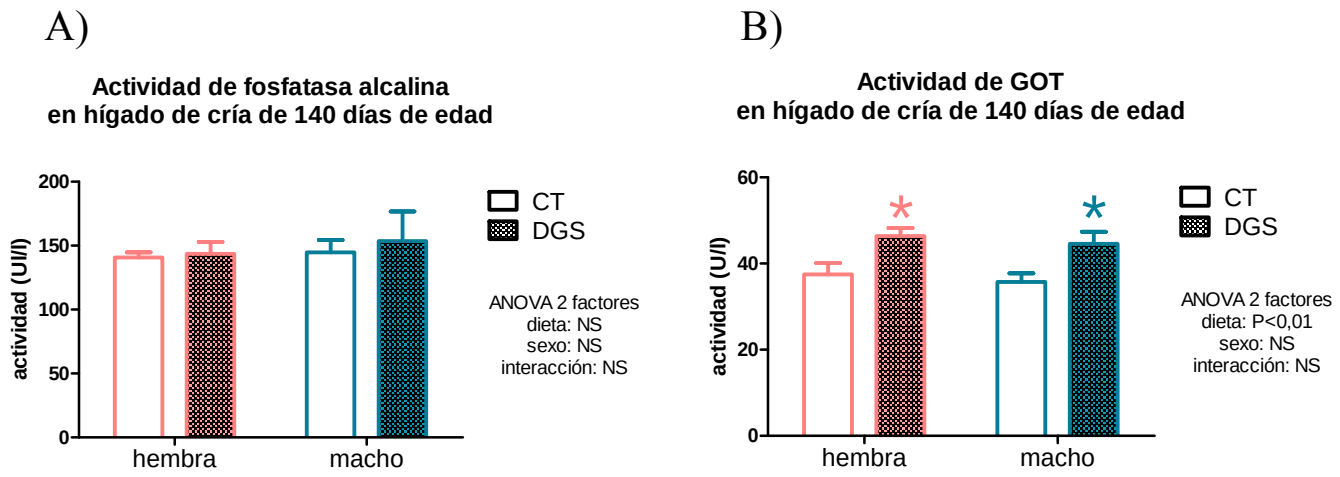
Figura 66: Niveles de ARN mensajero de MRP2, MRP3, MRP4 y Nrf2 en hígados de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).



Niveles de ARNm (PCR) de A) MRP2, B) MRP3, C) MRP4 y D) Nrf2 en hígados de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

En cuanto a la actividad GOT y fosfatasa alcalina plasmática, encontramos un aumento de la actividad de GOT en el plasma de crías hembra y macho de 140 días de edad del grupo DGS en relación al control (P<0,05, **Figura 67A**). No observamos diferencias respecto a la actividad plasmática de fosfatasa alcalina al comparar las crías de los grupos dietarios estudiados (**Figura 67B**). La actividad de las enzimas no mostró diferencias género-dependientes (**Figura 67**).

Figura 67: Actividad de las enzimas plasmáticas fosfatasa alcalina y glutamato oxalato transaminasa (GOT) en el plasma de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS).



Actividad de A) fosfatasa alcalina y B) glutamato oxalato transaminasa en el plasma de crías hembra y macho de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo CT y DGS. *P<0,05. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Resumen del Capítulo 5

Parte A: crías de 21 días de edad.

Observamos que la dieta materna con exceso de grasas saturadas (DGS) produjo un aumento de los niveles de triglicéridos plasmáticos de las crías. Además, en el hígado de las crías provenientes del grupo DGS encontramos acumulación de triglicéridos y alteraciones en los niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el catabolismo de lípidos como ACO y CPT1. También detectamos mayor producción de ON y mayores niveles de peroxidación lipídica y nitración proteica en estos hígados respecto de los hígados de crías provenientes del grupo control. Por otro lado, MRP2 y Nrf2, moléculas involucradas en la detoxificación hepática, se encontraron

disminuídas en los hígados de crías del grupo DGS. Por último, observamos que los niveles de ARN mensajero de ObRa se encontraron disminuidos en el hígado de crías macho mientras que los de ObR total se encontraron aumentados en el hígado de crías hembra y macho del grupo DGS.

Parte B: crías de 140 días de edad.

Si bien no observamos un aumento de los niveles de triglicéridos plasmáticos en las crías del grupo DGS, en sus hígados observamos acumulación de triglicéridos y alteraciones en los niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el catabolismo de lípidos como ACO y CPT1. También detectamos mayor producción de ON, mayores niveles de peroxidación lipídica y mayores niveles de proteínas nitradas en los hígados de crías del grupo DGS respecto de los hígados de crías provenientes del grupo control. Por otro lado, MRP2, MRP4 y Nrf2, moléculas involucradas en la detoxificación hepática, se encontraron disminuídas, al igual que la actividad las enzimas hepáticas fosfatasa alcalina y GOT, en los hígados de crías del grupo DGS respecto del grupo control. Observamos una disminución de la expresión proteica de ObR en el hígado de crías hembra y macho debido a la dieta grasa materna. Por último, en las crías del grupo DGS observamos un aumento en el índice HOMA que llega a ser significativo en las crías macho, evidenciando resistencia a la insulina.

DISCUSIÓN

En este trabajo de Tesis hemos desarrollado un modelo de sobrepeso en ratas gestantes mediante la alimentación con una dieta rica en grasas saturadas obtenida mediante el agregado de manteca al alimento estándar. El objetivo de este tratamiento fue reproducir algunas de las características presentes en mujeres que quedan embarazadas con sobrepeso y obesidad con la finalidad de estudiar alteraciones metabólicas inducidas durante la gestación en estas patologías, así como las consecuencias de estas alteraciones sobre la salud metabólica de la descendencia. Para ello, se suministró una dieta con alto contenido de grasas saturadas que simula en gran parte la oferta alimentaria a la que se exponen en la actualidad los humanos. Otras estrategias dietarias disponibles que simulan los malos hábitos alimenticios del humano en modelos experimentales son las dietas de cafetería ricas en glúcidos, grasas y sodio, sin embargo, la variedad de sus componentes dificulta el cálculo del aporte de calorías, la reproducibilidad y agrega la variable del aumento de sal dietario *(Sampey y col. 2011, Reynolds y col. 2015)*. Elegimos utilizar entonces una dieta con un 27% de grasas saturadas que representa el 47% de aporte energético. De acuerdo al corto ciclo de vida y tiempo reproductivo de los roedores, las dietas que inducen sobrepeso deben tener entre 30-65% de contenido calórico proveniente de grasas. En nuestro modelo, el 47% de las calorías provienen de la grasa, valor intermedio en comparación al de otras dietas con exceso de grasas utilizadas en roedores *(Ghibaudi y col. 2002, Niculescu y Lupu 2009, Carpenter y col. 2013)*. Mediante la administración de esta dieta logramos un incremento de un 8% de peso de manera previa a la gestación, valor similar al observado en otros modelos con 40 y 45% de aporte calórico por parte de las grasas *(Ghibaudi y col. 2002, Ferezou-Viala y col. 2007, Reynolds y col. 2015)* y menor respecto al observado en roedores alimentados con dietas que contienen un 60% de grasas como aporte calórico *(Niculescu y Lupu 2009, Liang y col. 2010, Carpenter y col. 2013)*.

En nuestro modelo de dieta con exceso de grasas saturadas registramos un consumo de gramos de alimento similar al grupo control (alimentado con dieta estándard) de manera previa a la gestación y menor respecto del grupo control durante la gestación. Sin embargo, los animales del grupo DGS incorporan más kilocalorías de manera previa y durante la gestación debido a que el alimento graso posee más kilocalorías por gramo respecto del alimento estándar. En relación a las ratas control, las ratas del grupo DGS comienzan la preñez con un mayor peso, y ganan más peso también durante la gestación (12% de aumento respecto de las ratas control). Este aumento de peso se debería, por un lado, al exceso de calorías consumidas y a la posiblemente incrementada masa grasa. Por otro lado, el mayor aumento de peso se registra en los últimos días de la gestación, lo que evidencia la contribución del aumento de peso placentario y fetal observado en el grupo DGS al aumento del peso materno.

El modelo dietario presenta un ligero incremento de peso de manera previa y durante la gestación, característica similar a la observada en gestantes humanas, por lo que podría proveer conslusiones útiles para la comprensión de las anomalías observadas en mujeres embarazadas con sobrepeso y prevenir el impacto negativo sobre la salud de la descendencia.

La placenta es el órgano de intercambio materno-fetal. Alteraciones en su estructura o función frente a cambios en el entorno intrauterino, como por ejemplo los generados por alteraciones en la nutrición materna, afectan el transporte de nutrientes placentario y condicionan la disponibilidad de nutrientes por parte del feto y en consecuencia su crecimiento y desarrollo *(Diaz y col. 2014, Dimasuay y col. 2016).* Es llamativo que en mujeres obesas se observe un aumento del porcentaje de neonatos tanto con alto como con bajo peso *(Gaccioli y col. 2013, Deshmukh y col. 2016).* La variedad de modelos experimentales disponibles reflejan estas diferencias. Existen modelos experimentales de obsesidad que permiten explicar el menor peso de neonatos estableciendo una asociación el menor peso de los fetos provenientes de madres obesas y la presencia de anomalías placentarias, que probablemente disminuyen el flujo de nutrientes al feto en desarrollo *(Hayes y col. 2012, Hayes y col. 2014).* De manera diferente, en nuestro modelo de sobrepeso encontramos macrosomía y placentomegalia. Estas características se observan en numerosos modelos de sobrepeso y obesidad tanto en humano como en modelos experimentales y se encuentran asociadas a un incremento de los transportadores de nutrientes placentarios, lo que podría inducir, junto con el incremento de sustratos metabólicos, la mayor afluencia de nutrientes al feto en desarrollo *(Jansson y col. 2013, Kim y col. 2014, Rosario y col. 2015, Rosario y col. 2016).*

Las madres del grupo DGS presentan elevados niveles de insulina y normales niveles de glucosa en circulación respecto de las madres del grupo control, lo que sugiere resistencia a la insulina, como lo estima el mayor valor de índice HOMA obtenido en el grupo DGS. La curva de tolerancia a la glucosa normal en estos animales implicaría que los altos niveles de insulina compensan la resistencia a la hormona y habilitan su normal acción. La resistencia a la insulina y la presencia de elevados niveles de triglicéridos en circulación son características frecuentes en gestantes con sobrepeso u obesidad *(Marseglia y col. 2014).* El aumento de lípidos incorporados mediante la dieta con exceso de grasas saturadas, junto con la resistencia a la insulina (que disminuye la incorporación de lípidos en el tejido adiposo), conducirían a un aumento de triglicéridos detectado en la circulación de las madres del grupo DGS. En los fetos provenientes de estas madres también encontramos mayores niveles de triglicéridos circulantes. Estos lípidos provendrían principalmente de la circulación materna a través de un incrementado transporte placentario, como se ha evidenciado en modelos similares *(Zhu y col. 2010, Diaz y col. 2015).* La ausencia de acumulación de lípidos en las placentas del grupo DGS sugiere que el exceso de lípidos

en la circulación materna no se estaría acumulando en la placenta sino que se transferiría hacia el feto originando la hipertrigliceridemia y sustentando así el sobre-crecimiento fetal.

En los fetos del grupo DGS encontramos elevados niveles de glucosa en circulación en presencia de altos niveles circulantes de insulina, de lo que se infiere que en estos animales la insulina es incapaz de disminuir los niveles de glucosa hasta el rango de normalidad, evidenciada en el mayor valor de índice fetal HOMA. La hiperglucemia fetal en ausencia de hiperglucemia materna podría deberse a una mayor afluencia de glucosa desde la madre o al producto de la resistencia a la insulina fetal, la cual resultaría en una disminución de la incorporación de glucosa en los órganos fetales y de la inhibicón de la gluconeogénesis hepática fetal *(Guo 2014, Acosta y col. 2015)*. El exceso de insulina en circulación fetal podría deberse a una producción pancreática exacerbada de la hormona como resultado de la acción de los altos niveles de glucosa. Estos resultados son similares a los observados por Catalano y col., que muestran que en gestantes humanas con sobrepeso la insulinemia materna y fetal se encuentra elevada, indicando resistencia a insulina en la madre y el feto *(Catalano y col. 2009)*.

En las placentas del grupo DGS encontramos mayores niveles de ARN mensajero del receptor de insulina (RI), con un predominio de su isoforma corta (RIA). Esta isoforma desencadena la totalidad de las funciones de la insulina, predomina en tejidos fetales y altamente proliferativos, y se encuentra involucrada principalmente en la señalización de procesos de proliferación y de sobrevida celular (frasca 1999). Se sabe que la insulina induce crecimiento placentario, de hecho se cree que a término, es la insulina fetal la que induce este crecimiento *(Fowden 2003, Hiden y col. 2009)*. Es por esto que sugerimos que el aumento del RIA estaría involucrado en el crecimiento placentario mediado por la acción de los elevados niveles de insulina circulante en el grupo DGS, y que tanto la hiperinsulinemia materna como fetal participarían de este efecto. El mayor tamaño placentario del grupo DGS podría indicar que este órgano presenta una mayor superficie de intercambio materno-fetal y probablemente un mayor número de transportadores de nutrientes, lo cual se asocia con un mayor transporte placentario *(Jansson y col. 2006)*. Por otro lado, es conocida la función de la insulina de incrementar el transporte de nutrientes placentario mediante la inducción de la traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática y la estimulación de la expresión y actividad de GLUT1 y de transportadores de aminoácidos *(Acevedo y col. 2005, Desvergne y col. 2006, Rosario y col. 2016)*. En un trabajo en colaboración se ha observado activación de la vía de mTOR en las placentas del grupo DGS *(Gaccioli y col. 2013)*. Esto sugiere que la elevada insulina circulante en este grupo incrementaría el transporte de aminoácidos y la síntesis de proteínas a través de la activación placentaria de mTOR, estimulando así el crecimiento placentario y sustentando el crecimiento fetal. Por otro lado, se ha reportado que la insulina incrementa la expresión de

transportadores de ácidos grasos, lo que se traduciría en un aumento en el transporte de lípidos al feto en desarrollo *(Magnusson-Olsson y col. 2006, Softic y col. 2012)*. Más aún, en esta Tesis observamos elevados niveles de ARN mensajero de LPL, resultado que también se encuentra en concordancia con la hipertrigliceridemia fetal observada en el grupo DGS. En su conjunto, estos resultados sugieren que el grupo DGS presentaría un incremento en el transporte placentario de nutrientes, como se ha visto en otros modelos de obesidad/sobrepeso *(Diaz y col. 2015, Rosario y col. 2016)*.

En el grupo DGS encontramos un aumento del peso fetal, elevados niveles de triglicéridos en circulación materna y fetal, mayores niveles de ARN mensajero de LPL placentario y elevados niveles de insulina materna y fetal, lo que sugiere un mayor transporte placentario de lípidos. Los elevados niveles de insulina materna y fetal, en combinación con un aumento del receptor de la hormona, podrían estar involucrados en el incremento del peso placentario observado en este grupo, que a su vez aumentaría el área de intercambio y el número de transportadores favoreciendo el transporte placentario de nutrientes.

Las placentas del grupo DGS mostraron mayor producción de óxido nítrico (ON) respecto de las del grupo control. En la placenta, el ON participa del proceso de angiogénesis y posee efectos vasodilatadores en la circulación feto-placentaria *(Myatt y col. 1991)*, lo que le confiere un rol clave en la modulación del flujo sanguíneo y el intercambio materno-fetal. Es así que el aumento de la producción de ON en las placentas del grupo DGS podría contribuir al mayor transporte de nutrientes hacia el feto. Sin embargo, no se puede descartar un efecto patológico del ON sobre la placenta dado que una excesiva producción de esta molécula puede asociarse a muerte celular, toxicidad e inflamación a través de la formación de especies reactivas del oxígeno y peroxinitritos *(Halliwell 2007, Myatt 2010)*. A pesar de haber encontrado un incremento en la peroxidación lipídica en las placentas del grupo DGS, la eficiencia placentaria (calculada como peso fetal/peso placentario) no se encuentra alterada, indicando que la capacidad de la placenta de sustentar el desarrollo fetal no se encuentra comprometida, probablemente debido a un incremento del área de intercambio y de transportadores, a lo que podría sumarse el efecto vasodilatador del ON, que contribuiría al transporte de nutrientes feto-placentario.

La leptina es una hormona producida por los adipocitos en respuesta a la insulina y a las reservas lipídicas, siendo sus niveles en circulación, proporcionales a la masa grasa corporal y un reflejo del estado de las reservas energéticas del organismo *(Maffei y col. 1995)*. Además de los adipocitos, existen numerosas fuentes productoras de leptina como la placenta, el hígado, la mucosa gástrica, la médula ósea, el músculo esquelético y el hipotálamo entre otras *(Hauguel-de Mouzon y col. 2006)*. Los niveles circulantes de leptina materna aumentan durante la gestación y se mantienen

elevados hasta el final de esta etapa, tanto en el humano como en la rata, y disminuyen abruptamente luego del parto, lo que sugiere que la placenta es una importante fuente productora de leptina *(Amico y col. 1998, Hauguel-de Mouzon y col. 2006)*. Se ha evidenciado que los niveles de leptina en plasma materno guardan relación con los de cordón umbilical y éstos a su vez correlacionan con el peso del neonato y con el peso de la placenta *(Jakimiuk y col. 2003, Manderson y col. 2003)*. Estas observaciones, en combinación con evidencias que sugieren que la leptina regula positivamente el transporte de aminoácidos y de ácidos grasos placentarios indicarían que la leptina tendría un rol en el crecimiento fetal *(Henson y Castracane 2006, von Versen-Hoynck y col. 2009, Mousiolis y col. 2012)*.

Los elevados niveles de la leptina del grupo DGS en circulación materna y fetal podrían inducir el crecimiento placentario y aumentar el transporte de nutrientes contribuyendo así con el sobrecrecimiento fetal.

La insulina regula positivamente la síntesis y secreción de leptina adipocitaria y placentaria *(Havel 2000, Perez-Perez y col. 2013)*. Trabajos previos en nuestro laboratorio encontraron menores niveles de leptina en explantos placentarios de ratas y pacientes diabéticas con bajos niveles de insulina *(White y col. 2004, White y col. 2006)*. En nuestro modelo de sobrepeso, que cursa con hiperinsulinemia materna, observamos elevados niveles de leptina en circulación materna y mayores niveles de ARN mensajero de leptina en la placenta. De manera similar, otros trabajos muestran un incremento de la leptinemia en modelos experimentales de obesidad y en humanos obesos *(Maffei y col. 1995, Scarpace y Zhang 2007)*. Como hemos mencionado, dos fuentes importantes de leptina son el tejido adiposo y la placenta *(Havel 2000, Maymo y col. 2011)*. Por lo tanto, la inducción adipocitaria de la producción de leptina por los elevados niveles de insulina podría contribuir con los elevados niveles de leptina en circulación materna en el grupo DGS. Por otro lado, los elevados niveles de ARN mensajero de leptina en las placentas del grupo DGS indicarían un aumento de la producción de la hormona que podría contribuir al incremento de los niveles en circulación materna. La hiperleptinemia también se observa en los fetos del grupo DGS. En el humano se encuentra estudiada la contribución de la leptina placentaria a la circulación materna y fetal, observándose que casi el total de la leptina placentaria es secretada hacia la circulación materna y siendo mínimo el pasaje de la hormona a través de la placenta en condiciones fisiológicas. Es así que la principal contribución a la leptina en circulación fetal se atribuye a la producción adipocitaria del feto humano *(Hoggard y col. 2001)*. En la rata, este tema es controversial y se encuentra poco estudiado. Algunos autores sugieren que la leptina materna podría ser transportada a través de la placenta hacia la circulación fetal mediante las isoformas cortas de su receptor *(Smith y Waddell 2003, Wu y col. 2015)*. Además de la leptina proveniente de la placenta, otras fuentes de leptina contribuirían en

mayor medida a los niveles de la hormona en circulación fetal, como el tejido adiposo subcutáneo en formación y otros tejidos fetales *(Hoggard y col. 1997, Muhlhausler y col. 2007, Qiao y col. 2012)*. Si bien poco se conoce acerca de la contribución de la leptina por parte del hígado fetal a la circulación, el incremento de los niveles de ARN mensajero de leptina encontrado en el hígado de fetos del grupo DGS sugiere una mayor producción hepática de esta hormona que podría contribuir a la hiperleptinemia observada en este grupo.

La hiperleptinemia materna observada en el grupo DGS podría deberse a la estimulación insulínica de la producción de leptina placentaria y adipocitaria. Por otra parte, la producción placentaria y hepática fetal podría contribuir con la hiperleptinemia fetal observada.

Los receptores de leptina se encuentran en la placenta de humanos y roedores, revelando un efecto parácrino/autócrino de la hormona *(Hoggard y col. 1997, Margetic y col. 2002)*. La isoforma larga del receptor (ObRb) posee todas las secuencias necesarias para la transducción de la señal completa, pudiendo desencadenar todos los efectos de la leptina tanto a nivel del sistema nervioso central como en la periferia. Las isoformas cortas del receptor, dentro de las cuales ObRa es la más abundante y estudiada, se encuentran involucradas en la señalización de la mayoría de las acciones periféricas de la leptina *(Murakami y col. 1997, Fruhbeck 2006)*. En nuestro modelo localizamos al receptor de leptina (ObR) en las tres zonas de la placenta de la rata: en la zona del laberinto, en la zona unión y en la decidua. Se ha demostrado que ObRb se expresa en la zona de unión y en el laberinto sin variación en función del día gestacional. De manera diferente, la expresión de ObRa en el laberinto aumenta hacia el final de la gestación, lo que sugiere que esta isoforma estaría sujeta a mecanismos de regulación específicos durante la etapa gestacional *(Smith y Waddell 2003)*. En las placentas del grupo de ratas alimentadas con la dieta con exceso de grasas saturadas observamos menores niveles de ARN mensajero de ObRa, lo que sugiere que, dado que el receptor se encuentra involucrado en la homeostasis energética, su expresión estaría modulada por el estado nutricional materno y fetal. No observamos cambios en los niveles de ARN mensajero de ObRb entre los grupos dietarios, lo que indicaría que su abundancia no se encontraría afectada por el estado nutricional del animal. Por otro lado, no observamos cambios en los niveles proteicos y/o localización de ObR placentario debido a la alimentación materna con exceso de grasas saturadas, lo que sugeriría que el potencial accionar de la hormona sobre la placenta no se encontraría afectado en este grupo.

Con el objetivo de discernir entre los efectos de leptina materna y fetal sobre la placenta, utilizamos un modelo de inyecciones intra-fetales de leptina, para ello, fetos de ratas control fueron inyectados con leptina o con vehículo los tres últimos días de la gestación. Las inyecciones con leptina resultaron en un incremento de los niveles de la hormona en la circulación fetal, siendo un

abordaje experimental útil para simular la hiperleptinemia fetal presente en el grupo DGS de manera independiente de otras variables que se encuentran también alteradas en este grupo (como por ejemplo la hiperlipidemia materna). Las inyecciones intra-fetales con leptina produjeron un aumento de los niveles de ARN mensajero de LPL en la placenta. Si bien es ampliamente conocida la capacidad de leptina de modular la lipólisis placentaria y se ha observado un aumento de la actividad de lipasas modelos de obesidad, no se ha estudiado la asociación entre estos eventos *(White y col. 2006, Dube y col. 2012)*. Nuestros resultados sugieren que los elevados niveles de leptina en circulación fetal en el grupo DGS podrían inducir el incremento de los niveles de ARN mensajero de LPL, contribuyendo así con el incrementado transporte placentario de triglicéridos propuesto en este grupo. El escaso conocimiento acerca del efecto de la leptina fetal sobre la placenta nos condujo a estudiar también el rol de la leptina fetal sobre su propio receptor en este órgano. Encontramos que las inyecciones intra-fetales con leptina produjeron una disminución de los niveles de ARN mensajero de ObRa en la placenta, mientras que no observamos cambios en los de ObRb. De esta manera, el aumento de los niveles de ARN mensajero de LPL y la disminución de los de ObRa observados tanto en las placentas de los fetos inyectados con leptina, como en las del grupo DGS, sugieren que la leptina fetal participaría en la modulación de la expresión génica de estas moléculas.

En el grupo DGS, los altos niveles de leptina en circulación fetal serían capaces de regular la expresión génica placentaria de su propio receptor y de la lipoproteína lipasa, modulando probablemente el propio accionar de la hormona y el transporte de lípidos placentario.

En la placenta del grupo DGS encontramos mayores niveles de ARN mensajero del marcador de células endoteliales von Willebrand (vWF), lo que sugiere un aumento de la angiogénesis. Se ha reportado la capacidad de la leptina de estimular la proliferación de células endoteliales *(Park y col. 2001, Liapakis y col. 2008)*, lo que indicaría que la hiperleptinemia materna y fetal del grupo DGS podría estar induciendo el incremento en los niveles de ARN mensajero de vWF y consecuentemente de la angiogénesis placentaria. Mediante la administración de inyecciones intra-fetales de leptina evaluamos la probable participación de la leptinemia fetal en los niveles de este marcador. Encontramos que la administración intra-fetal de leptina indujo un aumento de los niveles de ARN mensajero de vWF en la placenta, lo que podría indicar que la leptina fetal participaría en esta regulación y sustenta la idea de que la hiperleptinemia fetal del grupo DGS estaría induciendo la proliferación de células endoteliales placentarias. Por otro lado, en trabajos previos del laboratorio hemos visto que en la placenta la leptina induce la producción de ON, mediador involucrado en la regulación del tono vascular placentario *(White y col. 2006)*. Además se ha reportado que la leptina es moduladora de la presión sanguínea empleando como mediador al ON

(Beltowski y col. 2002). Además, hemos observado que la leptina estimula a células endoteliales placentarias humanas a formar tubos en dos dimensiones (en matrigel). Estos resultados en combinación con los conocidos efectos angiogénicos de esta hormona *(Sierra-Honigmann y col. 1998)* sugieren que los elevados niveles de leptina en el grupo DGS inducirían en la placenta un aumento de la angiogénesis, proceso que acompañaría al mayor crecimiento, evitando la hipoxia, incrementando el flujo sanguíneo y contribuyendo con un mayor transporte placentario de nutrientes. En otros trabajos se ha reportado una disminución de células endoteliales placentarias asociada a un menor tamaño y alteraciones en la vasculatura de la placenta, lo que se asocia a su vez a deficiencia placentaria y restricción del crecimiento uterino *(Liang y col. 2010, Hayes y col. 2012)*.

La hiperleptinemia materna y fetal impactaría sobre la placenta aumentando el flujo sanguíneo y el transporte de nutrientes, contribuyendo así al aumento de peso fetal observado en el grupo DGS.

El hígado almacena glucosa en forma de glucógeno y es capaz de liberarla o incorporarla contribuyendo a mantener la normoglucemia. Por otro lado, el hígado incorpora lípidos circulantes, que pueden ser oxidados o esterificados y empaquetados dentro de lipoproteínas, complejos macromoleculares que se liberan a la circulación y redistribuyen su contenido lipídico en los diferentes tejidos del organismo *(Desvergne y col. 2006)*. En condiciones de alta concentración de lípidos circulantes y resistencia a la insulina, se afecta el metabolismo de lípidos en el tejido adiposo, lo que genera hiperlipidemia y una mayor incorporación de lípidos hepática. Dentro del hepatocito, los ácidos grasos (tanto los incorporados desde la circulación como los que se forman a partir del exceso de glucosa mediante la lipogénesis), son metabolizados mediante su esterificación u oxidación, procesos que se encuentran incrementados como consecuencia de los mayores niveles de ácidos grasos disponibles *(Bradbury 2006)*. En el hígado fetal del grupo DGS se detecta una sobreacumulación de triglicéridos, la cual podría deberse a un aumento de los sustratos lipídicos en circulación fetal provenientes de la madre o a un desbalance entre la lipogénesis y la oxidación hepática de ácidos grasos. Asimismo, en el hígado de fetos del grupo DGS se observa, junto con la acumulación de triglicéridos, una disminución en los niveles de ARN mensajero de ACO y CPT1, transcriptos que codifican para enzimas clave en la β-oxidación mitocondrial y peroxisomal, respectivamente, sugiriendo que la sobreacumulación de triglicéridos podría deberse a una disminución de estas enzimas lipolíticas.

La leptina induce el catabolismo de lípidos en el tejido adiposo, el músculo y el hígado *(Muoio y Lynis Dohm 2002, Wein y col. 2007)*. Llama la atención que, a pesar de los elevados niveles de leptina en circulación fetal, el hígado de los fetos del grupo DGS presente sobreacumulación de triglicéridos. Estudiamos los niveles de ARN mensajero de leptina y sus

receptores en este órgano para conocer la producción local de la hormona y su potencial accionar. Como se ha mencionado, encontramos que la dieta materna con exceso de grasas saturadas induce un aumento de los niveles de ARN mensajero de leptina en el hígado fetal, sugiriendo una mayor producción de la hormona. En cuanto a los receptores de leptina, observamos un aumento de los niveles de ARN mensajero de ObRb en los hígados de fetos macho provenientes del grupo DGS y un aumento de los niveles proteicos de ObR en los hígados fetales hembra y macho del grupo DGS. Un mayor número de receptores podría indicar un mayor accionar de la leptina, es decir que la regulación positiva de los niveles de ObR podría aumentar los efectos lipolíticos de la hormona en un intento del hígado de metabolizar el exceso de lípidos captados desde la circulación. La leptina induce el catabolismo de lípidos en parte a través de PPARα, factor de transcripción que aumenta la expresión de ACO y CPT1 *(Lee y col. 2002)*. Encontramos que los hígados provenientes del grupo DGS presentan una disminución de los niveles de ARN mensajero de ACO y CPT1 sin variaciones en la expresión de PPARα. Otros autores han reportado anomalías en los niveles de ARN mensajero de ACO y CPT1 sin variaciones en los niveles de PPARα en hígados de fetos de modelos de obesidad o de hígado graso *(Shankar y col. 2010)*. Estas observaciones sugieren que la leptina podría tener un rol en la activación de PPARα, mediante la cual induciría la transcripción de ACO y CPT1.

La disminución de los niveles de ARN mensajero de ACO y CPT1 en el hígado de fetos del grupo DGS, en presencia de hiperleptinemia fetal y elevados niveles del receptor de esta hormona, sugieren una resistencia a la leptina en este órgano.

Con el objetivo de estudiar los efectos de los altos niveles de leptina en el plasma fetal (de manera sostenida y aislado del contexto de hiperlipidemia) sobre el hígado fetal, utilizamos el modelo de inyecciones intra-fetales de leptina en ratas control mencionado anteriormente. Observamos que la leptina administrada de manera intra-fetal disminuyó los niveles de ARN mensajero de ACO en el hígado de fetos macho, resultado similar al observado en el hígado de fetos macho del grupo DGS. Como el grupo DGS y las inyecciones con leptina comparten la condición de hiperleptinemia, creemos que ésta induciría la desensibilización de la señalización de leptina que resultaría en la disminución de ACO en el hígado del grupo DGS. De manera similar, otros autores observaron que la infusión con leptina desensibiliza la señalización de la hormona en el hígado de rata adulta *(Benomar y col. 2005)*. Sin embargo, otras anomalías observadas en el hígado del grupo DGS no pueden ser explicadas por la hiperleptinemia fetal aislada del contexto hiperlipidémico del grupo DGS. La ausencia de modulación de CPT1 por la administración fetal de leptina podría sugerir que la regulación negativa de ACO y CPT1 obedecerían a diferentes causas en el hígado de los fetos del grupo DGS, y que CPT1 podría ser blanco de regulaciones nutricionales independientes

de leptina. Una regulación diferencial de leptina sobre ACO y CPT1 fue reportada también en otros trabajos *(Lee y col. 2002)*.

Por otro lado, encontramos que la inyección de leptina a fetos control indujo una disminución de los niveles de ARN mensajero de ObRa y un aumento de los de LPL en el hígado fetal. Estos resultados son similares a los observados en las placentas de los fetos control inyectados con leptina, donde también observamos una disminución de los niveles de mensajero de ObRa y un aumento de los de LPL, como mencionamos anteriormente. Sin embargo, en el hígado fetal del grupo DGS no observamos la disminución de los niveles de mensajero de ObRa ni el aumento de los de LPL, aún en presencia de un ambiente hiperleptinémico, lo que vuelve a sugerir una resistencia del hígado fetal del grupo DGS al accionar de la leptina.

La ausencia de regulación de ObRa y LPL en el hígado fetal del grupo DGS a pesar del ambiente hiperleptinémico, condición similar a la recreada en los fetos control inyectados con leptina, sugiere una falta de respuesta a la leptina.

Mucho se ha estudiado acerca de la resistencia hipotalámica a leptina en modelos experimentales de obesidad *(Ladyman y col. 2012)*, sin embargo menos se conoce acerca de la resistencia periférica a la hormona en esta patología. Se ha observado resistencia hepática a leptina en un modelo experimental que desarrolla hígado graso no alcohólico y se ha encontrado falta de señalización a la leptina en hígados de ratas inyectadas con leptina, como se mencionó anteriormente *(Benomar y col. 2005, Vila y col. 2008)*. Con el objetivo de indagar acerca de la posible resistencia a la leptina en el hígado fetal del grupo DGS, cultivamos los hígados fetales de este grupo y del control en presencia y en ausencia de leptina y estudiamos el efecto de la hormona sobre algunos de sus genes blancos involucrados en el catabolismo de lípidos. La resistencia a la leptina propuesta inicialmente en los hígados del grupo DGS podría deberse a alteraciones en el accionar de la hormona y/o a alteraciones en su biodisponibilidad, involucrando esta última opción anomalías en el receptor de leptina, en la leptina y/o en los niveles de proteínas que regulan su biodisponibilidad como ObRe. Al cultivar los hígados fetales del grupo control en presencia de leptina observamos el clásico efecto lipolítico de la hormona: una disminución de los niveles tisulares de lípidos y un aumento de los niveles de ARN mensajero de los genes codificantes para las enzimas lipolíticas ACO y CPT1. En cambio, estos efectos no se observaron en los hígados del grupo DGS cultivados con leptina, lo que sugiere una resistencia a las acciones lipolíticas de la hormona. No se observó modulación de la expresión de PPARα por leptina en los hígados del grupo control ni del grupo DGS, lo que una vez más sugiere que esta hormona induciría la transcripción de ACO y CPT1 a través de la modulación de la actividad de PPARα. En los hígados del grupo DGS cultivados con leptina encontramos similares niveles del receptor de la hormona (respecto de los

hígados del grupo DGS cultivados en ausencia de leptina). Además la metodología permite descartar la influencia de factores solubles provenientes de la circulación del grupo DGS, lo cual nos permitiría inferir que la resistencia a la leptina observada en estos hígados se debería a alteraciones en el accionar de la hormona y no a alteraciones en su biodisponibilidad.

El cultivo de hígados fetales en presencia o ausencia de leptina evidenció una resistencia a las acciones lipolíticas de leptina en los hígados del grupo DGS.

La acumulación de lípidos, probablemente debida a la resistencia a leptina, y su consecuente lipotoxicidad en el hígado de fetos del grupo DGS podría predisponer el desencadenamiento de alteraciones metabólicas en este órgano en la etapa posnatal.

Las crías de 21 días de edad provenientes de madres alimentadas con la dieta con exceso de grasas saturadas presentaron mayor peso corporal y hepático respecto de las crías de ratas control. Además, al igual que en los fetos del grupo DGS, encontramos en estos animales un aumento de la trigliceridemia y una sobreacumulación de lípidos hepática. Cabe destacar, que la exposición al alimento con alto contenido graso se extiende hasta el destete, por lo que las crías de 21 días de edad del grupo DGS se encuetran expuestas al efecto del alimento con exceso de grasas saturadas desde sus primeras etapas del desarrollo y hasta el día de la eutanasia. De manera diferente, las crías de 140 días de edad del grupo DGS presentan peso corporal, peso hepático y parámetros plasmáticos similares a las crías de la misma edad provenientes de madres control. El cambio de alimentación hacia una dieta normograsa (control) luego del destete podría explicar la normalización del peso y los niveles circulantes de lípidos. Sin embargo, las crías de 140 días de edad del grupo DGS, al igual que las de 21 días de edad, presentaron sobreacumulación lipídica hepática, lo que señala el efecto de programación que posee la alimentación materna sobre el metabolismo lipídico hepático de la cría adulta, aún cuando la cría no consume el alimento de alto contenido graso dietario desde la finalización del destete. Otros trabajos presentan resultados similares restringiendo la exposición a la dieta con alto contenido graso a la gestación y/o a la lactancia, lo que señala la alta susceptibilidad del período intrauterino y posnatal temprano a la programación de anomalías metabólicas *(Shankar y col. 2008, Davenport y Cabrero 2009).* De manera interesante, se ha observado que la exposición a dietas con alto contenido graso de manera posterior al destete induce alteraciones en el metabolismo hepático más severas en las crías que fueron expuestas a la dieta grasa durante el desarrollo gestacional, lo que resalta el rol de la programación de susceptibilidad al desarrollo de hígado graso en la adultez *(Bayol y col. 2008).*

Con el objetivo de encontrar las causas de la sobreacumulación de triglicéridos observada en el hígado de las crías del grupo DGS analizamos los niveles de ARN mensajero de PPARα, ACO y CPT1 en este tejido y encontramos una disminución de ACO y CPT1 dependiente de la edad y el

sexo de la cría. Esta disminución de la enzimas lipolíticas se observa también en el hígado de madres y crías en otros modelos experimentales que presentan acumulación lipídica hepática *(Shankar y col. 2010, Jang y col. 2012, Bringhenti y col. 2015, Ornellas y col. 2015).* En nuestro modelo, los niveles hepáticos de PPARα no mostraron cambios en ninguna de las etapas del desarrollo estudiadas. Como la expresión de CPT1 y ACO se encuentra regulada por la actividad de PPARα *(Pyper y col. 2010)*, la disminución de ACO y CPT1 de manera independiente de los niveles de ARN mensajero de PPARα indicaría una disminución de la actividad de PPARα en el grupo DGS, como se ha mencionado anteriormente .

Al igual que lo sugerido en el caso del hígado fetal del grupo DGS, creemos que la disminución de la expresión de las enzimas lipolíticas ACO y CPT1 estaría involucrada en la sobreacumulación de triglicéridos hepática de las crías.

La programación de alteraciones en el metabolismo lipídico hepático durante la etapa intrauterina debido a la dieta materna con exceso de grasas saturadas, podría explicar las anomalías en el catabolismo lipídico observadas en el hígado de las crías del grupo DGS, en particular las observadas en las crías adultas, que consumen una dieta normograsa desde el destete hasta la eutanasia.

En cuanto a los receptores de leptina, en el hígado de las crías de 21 días de edad del grupo DGS no encontramos diferencias en los niveles de ARN mensajero de ObRb y encontramos menores niveles de ARN mensajero de ObRa. Al igual que lo observado en el hígado de fetos del grupo DGS, las crías de 21 días de edad de este grupo dietario mostraron mayores niveles proteicos de ObR, lo cual podría ser el resultado de un efecto compensatorio al menor efecto lipolítico de la leptina, como se mencionó anteriormente. En el hígado de las crías de 140 días de edad del grupo DGS observamos una normalización de los niveles de ARN mensajero de ObRa y ObRb, lo cual podría relacionarse con la normalización de la trigliceridemia en estos animales. Sin embargo, se observa una disminución de los niveles proteicos de ObR, lo que podría indicar una desensibilización del sistema y apunta a una modulación diferencial de la expresión génica y proteica de ObR por el estado nutricional.

La discrepancia entre ARN mensajero y proteína del receptor de leptina observada en los hígados de las diferentes edades gestacionales sugiere una regulación postranscripcional modulatoria de la vida media del ARN mensajero del receptor como así también una regulación postraduccional modulatoria de la vida media de su proteína.

Se ha reportado que la sobreacumulación lipídica y el exceso de ácidos grasos no esterificados genera un estado pro-inflamatorio y pro-oxidante en el hígado. La producción de las ROS se incrementa por encima de los niveles fisiológicos en los hígados que presentan

sobreacumulación lipídica. El exceso de ácidos grasos saturados y sus derivados celulares inducen lipotoxicidad mediada por estrés del retículo endoplásmico, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, eventos que resultan en un aumento de ROS y por lo tanto en una mayor peroxidación lipídica *(Fernandez-Sanchez y col. 2011, Mota y col. 2016)*. Además, como se ha mencionado, la exacerbada producción de ON induce acciones patológicas entre las cuales se encuentra la mayor formación de peroxinitritos, moléculas que oxidan y peroxidan lípidos y nitran proteínas comprometiendo la funcionalidad de las moléculas modificadas *(Roberts y Sindhu 2009)*.

En el hígado fetal y de las crías del grupo DGS encontramos una mayor producción de ON, mayores niveles de peroxidación lipídica y mayores niveles de proteínas nitradas, lo que indicaría la presencia de un ambiente pro-oxidante, probablemente originado a consecuencia de la sobreacumulación lipídica hepática.

El hígado es el principal órgano de detoxificación del organismo. En el proceso de detoxificación hepática intervienen numerosos transportadores encargados de incorporar los metabolitos tóxicos (tanto exobióticos como endobióticos) desde la sangre hacia dentro del hepatocito para su metabolización y posterior eliminación a través de la bilis o la sangre mediante transportadores como las MRPs (transportadores asociados a resistencia a multidroga) *(Klaassen y Aleksunes 2010)*. Los factores PPARα y Nrf2 inducen la transcripción de las MRPs y de enzimas antioxidantes *(Klaassen y Slitt 2005, Ma 2013)*. En el grupo DGS encontramos una disminución de los niveles de MRPs y Nrf2 dependiente de la edad y el sexo del feto/cría. Observamos menores niveles de mensajero de MRP2 en el hígado de fetos y crías; menores niveles de mensajero de MRP4 en el hígado de fetos y crías adultas; y menores niveles de mensajero de Nrf2 en el hígado de las crías.

Estos resultados sugieren que la alimentación materna con exceso de grasas saturadas programa la alteración de los mecanismos de detoxificación hepática mediados por las MRP en el hígado de la cría, condicionando la capacidad de respuesta a elementos tóxicos en la vida adulta de la descendencia.

Cuando los mecanismos de detoxificación y/o las defensas anti-oxidantes no pueden atenuar el ambiente pro-oxidante y disminuir los incrementados metabolitos tóxicos resultantes de la lipotoxicidad, se compromete la función del hígado *(Brumbaugh y Friedman 2014)*. El aumento de enzimas celulares hepáticas en circulación es un indicador de daño celular y/o disfunción hepática *(Giannini y col. 2005)*. El incremento de la actividad de fosfatasa alcalina en el plasma de fetos macho del grupo DGS y de la transaminasa glutámico oxalacética (GOT) en el plasma de crías adultas del grupo DGS indicaría una disfunción hepática, si bien otros parámetros necesitan ser estudiados para comprobarlo.

La regulación del balance energético se encuentra influenciada por las hormonas esteroideas sexuales gonadales *(Mystkowski y Schwartz 2000, Kautzky-Willer y Handisurya 2009)*. De forma interesante, se ha observado que muchas de las funciones de PPARα, especialmente aquéllas asociadas al metabolismo lipídico, se encuentran sujetas a una regulación género-dependiente, dentro de la cual el estrógeno posee un rol importante *(Yoon 2010, Rando y Wahli 2011)*. Se ha observado también que los heterodímeros de PPAR y de los receptores de estrógenos (RE) son capaces de unirse a elementos de respuesta a estrógenos, y que PPAR y RE comparten co-factores, lo que sugiere una interacción entre las funciones de estos receptores *(Keller y col. 1995, Tcherepanova y col. 2000, Zhu y col. 2000)*. En este trabajo no observamos dimorfismo sexual en los parámetros o moléculas analizadas en las ratas control. Sin embargo, la exposición a la dieta materna con exceso de grasas saturadas induce respuestas sexo-dependientes en los niveles de ARN mensajero de las enzimas del catabolismo de lípidos y las MRP así como en la actividad de las enzimas analizadas en plasma. Estos resultados sugieren que las diferencias género-dependientes observadas podrían deberse por un lado a la diferente regulación del balance energético en hembras y machos debido a las diferentes concentraciones de hormonas esteroideas sexuales gonadales presentes en estos animales. Por otro lado, este ambiente hormonal diferencial entre hembras y machos podría inducir una regulación diferencial sobre la actividad de PPARα, y en concecuencia sobre la expresión de los genes blanco de este factor (como son las MRPs, ACO y CPT1). En los últimos años se ha reportado que un desbalance nutricional y metabólico en la madre puede producir modificaciones epigenéticas en los órganos de la descendencia *(Donohoe y Bultman 2012)*. Trabajos recientes sugieren que los mecanismos epigenéticos se encuentran alterados en la placenta y el hígado fetal de gestantes obesas *(Gallou-Kabani y col. 2010, Panchenko y col. 2016)* y que estas alteraciones son sexo-dependientes. Estas evidencias sugieren que las alteraciones encontradas en respuesta al incremento de grasas saturadas en la dieta maderna, tanto en en la expresión génica como en las diferencias sexo-dependientes, podrían deberse, en parte, a modificaciones epigenéticas como producto del desbalance nutricional y metabólico materno.

Este trabajo refleja la importancia de la nutrición materna en la salud metabólica de la descendencia. El entorno metabólico materno impacta sobre la salud fetal programando alteraciones en la descendencia que no sólo alcanzan el metabolismo hepático sino que alteran su capacidad detoxificante. Se pone de relevancia el rol de la resistencia a la leptina junto con la probable falta de accionar de PPARα en el desarrollo de la programación de anomalías metabólicas en el hígado de la descendencia de rata alimentada con una dieta hipergrasa. Es notable que aún cuando las crías de 140 días de edad no presentan valores elevados de peso

corporal y de lípidos circulantes, muestran claras señales de alteraciones en el metabolismo y de un ambiente pro-oxidante, sugiriendo que no son indicadores suficientes para el diagnóstico de anomalías en el metabolismo de lípidos hepático en el individuo adulto. Nuestro trabajo indica también que los individuos que provienen de gestantes con sobrepeso son susceptibles a desarrollar alteraciones en el metabolismo de lípidos hepático aún si su alimentación durante la vida posnatal no es de alto contenido graso.

La alimentación saludable de la madre se hace indispensable para la correcta programación de mecanismos metabólicos que aseguren la salud de la descendencia. Surge la necesidad de ampliar el conocimiento de los mecanismos metabólicos alterados para el diseño de una dieta que atenúe/anule las alteraciones metabólicas inducidas por la programación intrauterina.

CONCLUSIÓN

En este estudio hemos evaluado el efecto del sobrepeso materno sobre algunos parámetros de la placenta y del metabolismo de lípidos en el hígado fetal y la descendencia. Para ello establecimos un modelo de sobrepeso materno mediante la alimentación de ratas Wistar con una dieta rica en grasas saturadas obtenida mediante el agregado de manteca al alimento estándar. El modelo dietario presenta un ligero incremento de peso de manera previa y durante la gestación, característica similar a la observada en gestantes humanas, lo que facilitaría el estudio de alteraciones metabólicas presentes en las ratas gestantes con sobrepeso y la extrapolación de algunas conclusiones en el humano.

Las ratas alimentadas con la dieta con exceso de grasas saturadas (grupo DGS) presentaron un aumento de peso placentario y fetal y un aumento de los niveles de insulina en circulación materna y fetal asociados a un estado de resistencia a la hormona. Además, el grupo DGS presentó elevados niveles de triglicéridos en plasma materno y fetal y un aumento de los niveles de ARN mensajero del receptor de insulina y de la lipoproteína lipasa (LPL) en la placenta. Los elevados niveles de insulina materna y fetal, en combinación con un aumento de su receptor, podrían estar involucrados en el incremento del peso placentario, que podría indicar un aumento del área de intercambio y del número de transportadores favoreciendo el transporte placentario de nutrientes. El mayor peso fetal, junto a la hipertrigliceridemia materna y también fetal y los elevados niveles de ARN mensajero de LPL en la placenta también sugieren un incremento en transporte placentario de lípidos. Además, el incremento en los niveles de óxido nítrico placentario podría aumentar el flujo sanguíneo, contribuyendo así al intercambio materno-fetal que sustentaría el sobrecrecimiento fetal observado en el grupo DGS. En concordancia con estas conclusiones, no se observan alteraciones en la eficiencia placentaria en el grupo DGS, lo que indica que la capacidad de la placenta de sustentar el desarrollo fetal no se encuentra comprometida. En resumen, nuestros resultados sugieren que la placenta del grupo DGS presenta un incremento en la transferencia de nutrientes al feto en desarrollo, en especial lípidos, que sustentarían un mayor crecimiento fetal.

El grupo DGS presentó elevados niveles de leptina en circulación materna y fetal así como elevados niveles del marcador de células endoteliales vWF. La hiperleptinemia fetal del grupo DGS podría explicarse por un incremento en los niveles de ARN mensajero placentario y del hígado fetal, que con su producción contribuirían con los elevados niveles en circulación. Trabajos previos señalan la capacidad de leptina de inducir la producción de óxido nítrico placentario, y hemos evidenciado la capacidad de leptina de inducir la formación en tubos en células endoteliales placentarias. Todas estas evidencias y resultados sugieren que el incremento de leptina en el grupo DGS podría inducir un aumento de la angiogénesis placentaria, quizás mediada por óxido nítrico, proceso que acompañaría al mayor crecimiento placentario aumentando el tono vascular y

contribuiría al aumento de la transferencia de nutrientes hacia el feto, sustentando así su sobrecrecimiento.

Las inyecciones intra-fetales de leptina evidenciaron que la leptina fetal inducirían un aumento de los niveles de ARN mensajero de LPL y una disminución de los de ObRa en las placentas, resultado también observado en las placentas del grupo DGS al compararlas con las del grupo control, lo que sugiere que los altos niveles de leptina en circulación fetal en el grupo DGS estarían regulando la expresión génica de su propio receptor y de la lipasa, modulando probablemente el propio accionar de la hormona y el transporte de lípidos placentario. Las inyecciones intra-fetales de leptina a fetos control indujeron también una disminución de los niveles de ARN mensajero de ObRa y un aumento de los niveles de ARN mensajero de LPL en el hígado fetal. Sin embargo, en el hígado fetal del grupo DGS, el cual se encuentra inmerso en un ambiente hiperleptinemico, no observamos variaciones en los niveles de ARN mensajero de ObRa o LPL, lo que sugiere una falta de respuesta del hígado a la leptina.

El incremento de grasas saturadas en la dieta materna produjo una sobreacumulación de lípidos en el hígado fetal. Conociendo que la leptina induce el catabolismo de lípidos en el hígado, la disminución de los niveles de ARN mensajero de ACO y CPT1 en el hígado del grupo DGS en presencia de hiperleptinemia fetal y elevados niveles del receptor de la hormona vuelve a sugerir una resistencia a la leptina en este órgano.

El cultivo de explantos de hígados fetales del grupo control en presencia de leptina evidenció el clásico efecto lipolítico de la hormona: una disminución de los niveles tisulares de lípidos y un aumento de la transcripción de los genes codificantes para las enzimas lipolíticas ACO y CPT1. En cambio, estos efectos no se observaron en los hígados del grupo DGS cultivados con leptina, lo que añade una evidencia más que sugiere una resistencia a las acciones lipolíticas de leptina en los hígados de fetos del grupo DGS.

La sobreacumulación hepática de lípidos se observa también en las crías del grupo DGS. Al igual que lo sugerido en el caso del hígado fetal del grupo DGS, creemos que la disminución de la expresión de las enzimas lipolíticas ACO y CPT1 detectada en el hígado de las crías estaría involucrada en la sobreacumulación de triglicéridos en este órgano. Como se conoce que la expresión de CPT1 y ACO se encuentra regulada por la actividad de PPARα, la disminución de ACO y CPT1 de manera independiente de los niveles de PPARα en los hígados de fetos y crías podría indicar una disminución de la actividad de PPARα en el grupo DGS.

La programación de alteraciones en el metabolismo lipídico hepático durante la etapa intrauterina debido a la dieta materna con exceso de grasas saturadas, podría explicar las anomalías en el catabolismo lipídico observadas en el hígado de las crías del grupo DGS, en particular las

observadas en las crías adultas, que consumen una dieta normograsa desde el destete hasta la eutanasia.

Los elevados niveles de ON, peroxidación lipídica y proteínas nitradas, indicarían la presencia de un ambiente pro-oxidante, probablemente originado como consecuencia de la sobreacumulación lipídica hepática observada en el grupo DGS. Además, la disminución de los niveles de MRPs y Nrf2 sugiere que los hígados del grupo DGS presentan alteraciones en los mecanismos de detoxificación y en la capacidad de defensa antioxidante, probablemente debido a la lipotoxicidad inducida por las anomalías del metabolismo lipídico que se inducen durante la vida intrauterina y persisten en las crías jóvenes y adultas de las madres alimentadas con un exceso de grasas saturadas.

En este trabajo hemos evidenciado anomalías placentarias y hepáticas en la descendencia de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas saturadas. Es notable que las crías adultas no presenten incremento de peso o hiperlipidemia y escasas alteraciones en los niveles de enzimas hepáticas en circulación y aún así su hígado presente alteraciones que podrían comprometer su función. La programación de estas alteraciones se evidencia en las crías adultas a pesar de mantener una alimentación normograsa lo que pone de relevancia la programación de la susceptibilidad al desarrollo de patologías metabólicas del modelo utilizado. Cabe señalar que a partir del conocimiento de los mecanismos involucrados en las vías metabólicas que se encuentran alteradas en este modelo de sobrepeso, se podrían planificar estrategias para evitar o mejorar las complicaciones en la salud metabólica asociadas al sobrepeso y la obesidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahamsohn, PA y Zorn, TM (1993). "Implantation and decidualization in rodents." J Exp Zool **266**(6): 603-628.

Abumrad, N; Coburn, C y Ibrahimi, A (1999). "Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm." Biochim Biophys Acta **1441**(1): 4-13.

Acevedo, CG; Marquez, JL; Rojas, S y Bravo, I (2005). "Insulin and nitric oxide stimulates glucose transport in human placenta." Life Sci **76**(23): 2643-2653.

Acosta, O; Ramirez, VI; Lager, S; Gaccioli, F; Dudley, DJ; Powell, TL y Jansson, T (2015). "Increased glucose and placental GLUT-1 in large infants of obese nondiabetic mothers." Am J Obstet Gynecol **212**(2): 227 e221-227.

Adamson, SL; Lu, Y; Whiteley, KJ; Holmyard, D; Hemberger, M; Pfarrer, C y Cross, JC (2002). "Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta." Dev Biol **250**(2): 358-373.

Adibhatla, RM y Hatcher, JF (2008). "Phospholipase A(2), reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies." BMB Rep **41**(8): 560-567.

Adler, RR; Ng, AK y Rote, NS (1995). "Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, JAR." Biol Reprod **53**(4): 905-910.

Ahima, RS; Prabakaran, D; Mantzoros, C; Qu, D; Lowell, B; Maratos-Flier, E y Flier, JS (1996). "Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting." Nature **382**(6588): 250-252.

Ahmed, A y Perkins, J (2000). "Angiogenesis and intrauterine growth restriction." Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **14**(6): 981-998.

Al-Rasadi, K; Rizzo, M; Montalto, G y Berg, G (2015). "Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Cardiovascular Risk, and Carotid Inflammation." Angiology **66**(7): 601-603.

Albrecht, ED y Pepe, GJ (1990). "Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy." Endocr Rev **11**(1): 124-150.

Aleixandre, A y Miguel, M (2008). "Zucker rats as an experimental model for the study of various diseases." Endocrinol Nutr **55**(5): 217-222.

Amacher, DE (2016). "The regulation of human hepatic drug transporter expression by activation of xenobiotic-sensing nuclear receptors." Expert Opin Drug Metab Toxicol: 1-15.

Ambrosini, GL (2014). "Childhood dietary patterns and later obesity: a review of the evidence." Proc Nutr Soc **73**(1): 137-146.

Amico, JA; Thomas, A; Crowley, RS y Burmeister, LA (1998). "Concentrations of leptin in the serum of pregnant, lactating, and cycling rats and of leptin messenger ribonucleic acid in rat placental tissue." Life Sci **63**(16): 1387-1395.

Amusquivar, E y Herrera, E (2003). "Influence of changes in dietary fatty acids during pregnancy on placental and fetal fatty acid profile in the rat." Biol Neonate **83**(2): 136-145.

Arner, E; Westermark, PO; Spalding, KL; Britton, T; Ryden, M; Frisen, J; Bernard, S y Arner, P (2010). "Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology." Diabetes **59**(1): 105-109.

Asano, T; Yoshida, R; Ogata, H; Kokawa, K; Ogimoto, M; Akehi, Y; Anzai, K; Ono, J; Tamura, K; Hidehira, K y Kikuchi, M (2007). "Beta-cell function is a major contributor to oral glucose disposition in obese Japanese students." Endocr J **54**(6): 903-910.

Balligand, JL; Kobzik, L; Han, X; Kaye, DM; Belhassen, L; O'Hara, DS; Kelly, RA; Smith, TW y Michel, T (1995). "Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes." J Biol Chem **270**(24): 14582-14586.

Banks, WA; Kastin, AJ; Huang, W; Jaspan, JB y Maness, LM (1996). "Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin." Peptides **17**(2): 305-311.

Barker, DJ (2007). "The origins of the developmental origins theory." J Intern Med **261**(5): 412-417.

Barker, DJ; Gluckman, PD; Godfrey, KM; Harding, JE; Owens, JA y Robinson, JS (1993). "Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life." Lancet **341**(8850): 938-941.

Barker, DJ y Osmond, C (1986). "Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales." Lancet **1**(8489): 1077-1081.

Barker, DJ; Winter, PD; Osmond, C; Margetts, B y Simmonds, SJ (1989). "Weight in infancy and death from ischaemic heart disease." Lancet **2**(8663): 577-580.

Barr, VA; Malide, D; Zarnowski, MJ; Taylor, SI y Cushman, SW (1997). "Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue." Endocrinology **138**(10): 4463-4472.
Barthel, A y Schmoll, D (2003). "Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis." Am J Physiol Endocrinol Metab **285**(4): E685-692.
Bartness, TJ; Shrestha, YB; Vaughan, CH; Schwartz, GJ y Song, CK (2010). "Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis." Mol Cell Endocrinol **318**(1-2): 34-43.
Basak, S y Duttaroy, AK (2012). "Leptin induces tube formation in first-trimester extravillous trophoblast cells." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **164**(1): 24-29.
Batra, A; Okur, B; Glauben, R; Erben, U; Ihbe, J; Stroh, T; Fedke, I; Chang, HD; Zeitz, M y Siegmund, B (2010). "Leptin: a critical regulator of CD4+ T-cell polarization in vitro and in vivo." Endocrinology **151**(1): 56-62.
Battiprolu, PK; Hojayev, B; Jiang, N; Wang, ZV; Luo, X; Iglewski, M; Shelton, JM; Gerard, RD; Rothermel, BA; Gillette, TG; Lavandero, S y Hill, JA (2012). "Metabolic stress-induced activation of FoxO1 triggers diabetic cardiomyopathy in mice." J Clin Invest **122**(3): 1109-1118.
Baumann, MU; Deborde, S y Illsley, NP (2002). "Placental glucose transfer and fetal growth." Endocrine **19**(1): 13-22.
Baumann, MU; Schneider, H; Malek, A; Palta, V; Surbek, DV; Sager, R; Zamudio, S y Illsley, NP (2014). "Regulation of human trophoblast GLUT1 glucose transporter by insulin-like growth factor I (IGF-I)." PLoS One **9**(8): e106037.
Baylis, C y Vallance, P (1998). "Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine--what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system?" Curr Opin Nephrol Hypertens **7**(1): 59-62.
Bayol, SA; Simbi, BH; Bertrand, JA y Stickland, NC (2008). "Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females." J Physiol **586**(13): 3219-3230.
Beckman, JS y Koppenol, WH (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." Am J Physiol **271**(5 Pt 1): C1424-1437.
Belfiore, A; Frasca, F; Pandini, G; Sciacca, L y Vigneri, R (2009). "Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease." Endocr Rev **30**(6): 586-623.
Belgardt, BF y Bruning, JC (2010). "CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis." Ann N Y Acad Sci **1212**: 97-113.
Belouzard, S; Delcroix, D y Rouille, Y (2004). "Low levels of expression of leptin receptor at the cell surface result from constitutive endocytosis and intracellular retention in the biosynthetic pathway." J Biol Chem **279**(27): 28499-28508.
Beltowski, J; Wojcicka, G y Borkowska, E (2002). "Human leptin stimulates systemic nitric oxide production in the rat." Obes Res **10**(9): 939-946.
Benkhoff, S; Loot, AE; Pierson, I; Sturza, A; Kohlstedt, K; Fleming, I; Shimokawa, H; Grisk, O; Brandes, RP y Schroder, K (2012). "Leptin potentiates endothelium-dependent relaxation by inducing endothelial expression of neuronal NO synthase." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(7): 1605-1612.
Benomar, Y; Wetzler, S; Larue-Achagiotis, C; Djiane, J; Tome, D y Taouis, M (2005). "In vivo leptin infusion impairs insulin and leptin signalling in liver and hypothalamus." Mol Cell Endocrinol **242**(1-2): 59-66.
Berger, J y Moller, DE (2002). "The mechanisms of action of PPARs." Annu Rev Med **53**: 409-435.
Bernotiene, E; Palmer, G y Gabay, C (2006). "The role of leptin in innate and adaptive immune responses." Arthritis Res Ther **8**(5): 217.
Bhakkiyalakshmi, E; Sireesh, D; Sakthivadivel, M; Sivasubramanian, S; Gunasekaran, P y Ramkumar, KM (2016). "Anti-hyperlipidemic and anti-peroxidative role of pterostilbene via Nrf2 signaling in experimental diabetes." Eur J Pharmacol **777**: 9-16.
Bindoli, A; Fukuto, JM y Forman, HJ (2008). "Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling." Antioxid Redox Signal **10**(9): 1549-1564.
Bjorbaek, C; El-Haschimi, K; Frantz, JD y Flier, JS (1999). "The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance." J Biol Chem **274**(42): 30059-30065.

Bjorbaek, C; Uotani, S; da Silva, B y Flier, JS (1997). "Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor." J Biol Chem **272**(51): 32686-32695.
Bjorbak, C; Lavery, HJ; Bates, SH; Olson, RK; Davis, SM; Flier, JS y Myers, MG, Jr. (2000). "SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985." J Biol Chem **275**(51): 40649-40657.
Bligh, EG y Dyer, WJ (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." Can J Biochem Physiol **37**(8): 911-917.
Boney, CM; Verma, A; Tucker, R y Vohr, BR (2005). "Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus." Pediatrics **115**(3): e290-296.
Bouloumie, A; Drexler, HC; Lafontan, M y Busse, R (1998). "Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis." Circ Res **83**(10): 1059-1066.
Bradbury, MW (2006). "Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **290**(2): G194-198.
Bradford, MM (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
Bray, GA (2004). "Medical consequences of obesity." J Clin Endocrinol Metab **89**(6): 2583-2589.
Bredt, DS; Ferris, CD y Snyder, SH (1992). "Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites." J Biol Chem **267**(16): 10976-10981.
Brenseke, B; Prater, MR; Bahamonde, J y Gutierrez, JC (2013). "Current thoughts on maternal nutrition and fetal programming of the metabolic syndrome." J Pregnancy **2013**: 368461.
Brett, KE; Ferraro, ZM; Yockell-Lelievre, J; Gruslin, A y Adamo, KB (2014). "Maternal-fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta." Int J Mol Sci **15**(9): 16153-16185.
Bringhenti, I; Ornellas, F; Martins, MA; Mandarim-de-Lacerda, CA y Aguila, MB (2015). "Early hepatic insult in the offspring of obese maternal mice." Nutr Res **35**(2): 136-145.
Browning, JD y Horton, JD (2004). "Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury." J Clin Invest **114**(2): 147-152.
Brumbaugh, DE y Friedman, JE (2014). "Developmental origins of nonalcoholic fatty liver disease." Pediatr Res **75**(1-2): 140-147.
Bruning, JC; Gautam, D; Burks, DJ; Gillette, J; Schubert, M; Orban, PC; Klein, R; Krone, W; Muller-Wieland, D y Kahn, CR (2000). "Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction." Science **289**(5487): 2122-2125.
Buchbinder, A; Lang, U; Baker, RS; Khoury, JC; Mershon, J y Clark, KE (2001). "Leptin in the ovine fetus correlates with fetal and placental size." Am J Obstet Gynecol **185**(4): 786-791.
Campbell, FM; Gordon, MJ y Dutta-Roy, AK (1994). "Plasma membrane fatty acid-binding protein (FABPpm) of the sheep placenta." Biochim Biophys Acta **1214**(2): 187-192.
Campfield, LA; Smith, FJ; Guisez, Y; Devos, R y Burn, P (1995). "Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks." Science **269**(5223): 546-549.
Camps, L; Reina, M; Llobera, M; Bengtsson-Olivecrona, G; Olivecrona, T y Vilaro, S (1991). "Lipoprotein lipase in lungs, spleen, and liver: synthesis and distribution." J Lipid Res **32**(12): 1877-1888.
Capobianco, E; Martinez, N; Higa, R; White, V y Jawerbaum, A (2008). "The effects of maternal dietary treatments with natural PPAR ligands on lipid metabolism in fetuses from control and diabetic rats." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **79**(6): 191-199.
Carpenter, KC; Strohacker, K y McFarlin, BK (2013). "Considerations to maximize fat mass gain in a mouse model of diet-induced weight gain." Lab Anim **47**(4): 266-273.
Casabiell, X; Pineiro, V; Peino, R; Lage, M; Camina, J; Gallego, R; Vallejo, LG; Dieguez, C y Casanueva, FF (1998). "Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men." J Clin Endocrinol Metab **83**(6): 2149-2155.
Catalano, PM; Presley, L; Minium, J y Hauguel-de Mouzon, S (2009). "Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero." Diabetes Care **32**(6): 1076-1080.
Ceddia, RB (2005). "Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis." Int J Obes (Lond) **29**(10): 1175-1183.

Cinti, S; Mitchell, G; Barbatelli, G; Murano, I; Ceresi, E; Faloia, E; Wang, S; Fortier, M; Greenberg, AS y Obin, MS (2005). "Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans." J Lipid Res **46**(11): 2347-2355.
Coatmellec-Taglioni, G; Dausse, JP; Giudicelli, Y y Ribiere, C (2003). "Sexual dimorphism in cafeteria diet-induced hypertension is associated with gender-related difference in renal leptin receptor down-regulation." J Pharmacol Exp Ther **305**(1): 362-367.
Coleman, DL (1978). "Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice." Diabetologia **14**(3): 141-148.
Coleman, DL y Hummel, KP (1969). "Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice." Am J Physiol **217**(5): 1298-1304.
Coleman, RA; Lewin, TM y Muoio, DM (2000). "Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis." Annu Rev Nutr **20**: 77-103.
Conrad, KP; Vill, M; McGuire, PG; Dail, WG y Davis, AK (1993). "Expression of nitric oxide synthase by syncytiotrophoblast in human placental villi." FASEB J **7**(13): 1269-1276.
Considine, RV; Sinha, MK; Heiman, ML; Kriauciunas, A; Stephens, TW; Nyce, MR; Ohannesian, JP; Marco, CC; McKee, LJ; Bauer, TL y et al. (1996). "Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans." N Engl J Med **334**(5): 292-295.
Crabtree, JT; Gordon, MJ; Campbell, FM y Dutta-Roy, AK (1998). "Differential distribution and metabolism of arachidonic acid and docosahexaenoic acid by human placental choriocarcinoma (BeWo) cells." Mol Cell Biochem **185**(1-2): 191-198.
Cross, JC (1998). "Formation of the placenta and extraembryonic membranes." Ann N Y Acad Sci **857**: 23-32.
Cross, JC; Werb, Z y Fisher, SJ (1994). "Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle." Science **266**(5190): 1508-1518.
Cunningham, P y McDermott, L (2009). "Long chain PUFA transport in human term placenta." J Nutr **139**(4): 636-639.
Czech, MP (1982). "Structural and functional homologies in the receptors for insulin and the insulin-like growth factors." Cell **31**(1): 8-10.
Challier, J; Galtier, M; Bintein, T; Cortez, A; Lepercq, J y Hauguel-de Mouzon, S (2003). "Placental leptin receptor isoforms in normal and pathological pregnancies." Placenta **24**(1): 92-99.
Chandra, P y Brouwer, KL (2004). "The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts." Pharm Res **21**(5): 719-735.
Chien, EK; Hara, M; Rouard, M; Yano, H; Phillippe, M; Polonsky, KS y Bell, GI (1997). "Increase in serum leptin and uterine leptin receptor messenger RNA levels during pregnancy in rats." Biochem Biophys Res Commun **237**(2): 476-480.
Chmurzynska, A (2006). "The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism." J Appl Genet **47**(1): 39-48.
Choi, SM; Tucker, DF; Gross, DN; Easton, RM; DiPilato, LM; Dean, AS; Monks, BR y Birnbaum, MJ (2010). "Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway." Mol Cell Biol **30**(21): 5009-5020.
Christiansen-Weber, TA; Voland, JR; Wu, Y; Ngo, K; Roland, BL; Nguyen, S; Peterson, PA y Fung-Leung, WP (2000). "Functional loss of ABCA1 in mice causes severe placental malformation, aberrant lipid distribution, and kidney glomerulonephritis as well as high-density lipoprotein cholesterol deficiency." Am J Pathol **157**(3): 1017-1029.
D'Eon, TM; Souza, SC; Aronovitz, M; Obin, MS; Fried, SK y Greenberg, AS (2005). "Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways." J Biol Chem **280**(43): 35983-35991.
Davenport, MH y Cabrero, MR (2009). "Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet." J Physiol **587**(Pt 14): 3423-3424.
Dawson, VL; Dawson, TM; London, ED; Bredt, DS y Snyder, SH (1991). "Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(14): 6368-6371.
Demarquoy, J y Le Borgne, F (2015). "Crosstalk between mitochondria and peroxisomes." World J Biol Chem **6**(4): 301-309.

Denninger, JW y Marletta, MA (1999). "Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway." Biochim Biophys Acta **1411**(2-3): 334-350.
Deshmukh, VL; Jadhav, M y Yelikar, K (2016). "Impact of HIGH BMI on Pregnancy: Maternal and Foetal Outcome." J Obstet Gynaecol India **66**(Suppl 1): 192-197.
Desvergne, B; Michalik, L y Wahli, W (2006). "Transcriptional regulation of metabolism." Physiol Rev **86**(2): 465-514.
Diaz, P; Harris, J; Rosario, FJ; Powell, TL y Jansson, T (2015). "Increased placental fatty acid transporter 6 and binding protein 3 expression and fetal liver lipid accumulation in a mouse model of obesity in pregnancy." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **309**(12): R1569-1577.
Diaz, P; Powell, TL y Jansson, T (2014). "The role of placental nutrient sensing in maternal-fetal resource allocation." Biol Reprod **91**(4): 82.
Dimasuay, KG; Boeuf, P; Powell, TL y Jansson, T (2016). "Placental Responses to Changes in the Maternal Environment Determine Fetal Growth." Front Physiol **7**: 12.
Donato, J, Jr.; Frazao, R y Elias, CF (2010). "The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin." Arq Bras Endocrinol Metabol **54**(7): 591-602.
Donohoe, DR y Bultman, SJ (2012). "Metaboloepigenetics: interrelationships between energy metabolism and epigenetic control of gene expression." J Cell Physiol **227**(9): 3169-3177.
Dube, E; Gravel, A; Martin, C; Desparois, G; Moussa, I; Ethier-Chiasson, M; Forest, JC; Giguere, Y; Masse, A y Lafond, J (2012). "Modulation of fatty acid transport and metabolism by maternal obesity in the human full-term placenta." Biol Reprod **87**(1): 14, 11-11.
Ducharme, NA y Bickel, PE (2008). "Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis." Endocrinology **149**(3): 942-949.
Duttaroy, AK (2009). "Transport of fatty acids across the human placenta: a review." Prog Lipid Res **48**(1): 52-61.
El-Haschimi, K; Pierroz, DD; Hileman, SM; Bjorbaek, C y Flier, JS (2000). "Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity." J Clin Invest **105**(12): 1827-1832.
Erickson, JC; Hollopeter, G y Palmiter, RD (1996). "Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y." Science **274**(5293): 1704-1707.
Esposito, K; Ciardiello, F y Giugliano, D (2014). "Unhealthy diets: a common soil for the association of metabolic syndrome and cancer." Endocrine **46**(1): 39-42.
Farley, D; Tejero, ME; Comuzzie, AG; Higgins, PB; Cox, L; Werner, SL; Jenkins, SL; Li, C; Choi, J; Dick, EJ, Jr.; Hubbard, GB; Frost, P; Dudley, DJ; Ballesteros, B; Wu, G; Nathanielsz, PW y Schlabritz-Loutsevitch, NE (2009). "Feto-placental adaptations to maternal obesity in the baboon." Placenta **30**(9): 752-760.
Faust, IM; Johnson, PR; Stern, JS y Hirsch, J (1978). "Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity." Am J Physiol **235**(3): E279-286.
Federici, M; Hribal, M; Perego, L; Ranalli, M; Caradonna, Z; Perego, C; Usellini, L; Nano, R; Bonini, P; Bertuzzi, F; Marlier, LN; Davalli, AM; Carandente, O; Pontiroli, AE; Melino, G; Marchetti, P; Lauro, R; Sesti, G y Folli, F (2001). "High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program." Diabetes **50**(6): 1290-1301.
Feingold, KR (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins.
Ferezou-Viala, J; Roy, AF; Serougne, C; Gripois, D; Parquet, M; Bailleux, V; Gertler, A; Delplanque, B; Djiane, J; Riottot, M y Taouis, M (2007). "Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **293**(3): R1056-1062.
Fernandez-Sanchez, A; Madrigal-Santillan, E; Bautista, M; Esquivel-Soto, J; Morales-Gonzalez, A; Esquivel-Chirino, C; Durante-Montiel, I; Sanchez-Rivera, G; Valadez-Vega, C y Morales-Gonzalez, JA (2011). "Inflammation, oxidative stress, and obesity." Int J Mol Sci **12**(5): 3117-3132.
Foretz, M; Guichard, C; Ferre, P y Foufelle, F (1999). "Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12737-12742.

Forhead, AJ y Fowden, AL (2009). "The hungry fetus? Role of leptin as a nutritional signal before birth." J Physiol **587**(Pt 6): 1145-1152.
Forstermann, U; Closs, EI; Pollock, JS; Nakane, M; Schwarz, P; Gath, I y Kleinert, H (1994). "Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions." Hypertension **23**(6 Pt 2): 1121-1131.
Forstermann, U; Pollock, JS; Schmidt, HH; Heller, M y Murad, F (1991). "Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(5): 1788-1792.
Fotbolcu, H y Zorlu, E (2016). "Nonalcoholic fatty liver disease as a multi-systemic disease." World J Gastroenterol **22**(16): 4079-4090.
Fowden, AL (2003). "The insulin-like growth factors and feto-placental growth." Placenta **24**(8-9): 803-812.
Fowden, AL; Sferruzzi-Perri, AN; Coan, PM; Constancia, M y Burton, GJ (2009). "Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation." J Physiol **587**(Pt 14): 3459-3472.
Frasca, F; Pandini, G; Scalia, P; Sciacca, L; Mineo, R; Costantino, A; Goldfine, ID; Belfiore, A y Vigneri, R (1999). "Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells." Mol Cell Biol **19**(5): 3278-3288.
Frederick, IO; Williams, MA; Sales, AE; Martin, DP y Killien, M (2008). "Pre-pregnancy body mass index, gestational weight gain, and other maternal characteristics in relation to infant birth weight." Matern Child Health J **12**(5): 557-567.
Frederich, RC; Hamann, A; Anderson, S; Lollmann, B; Lowell, BB y Flier, JS (1995). "Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action." Nat Med **1**(12): 1311-1314.
Friedman, JM (2004). "Modern science versus the stigma of obesity." Nat Med **10**(6): 563-569.
Friedman, JM y Halaas, JL (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals." Nature **395**(6704): 763-770.
Fruhbeck, G (2006). "Intracellular signalling pathways activated by leptin." Biochem J **393**(Pt 1): 7-20.
Fruhbeck, G y Gomez-Ambrosi, J (2001). "Rationale for the existence of additional adipostatic hormones." FASEB J **15**(11): 1996-2006.
Fujimoto, T y Parton, RG (2011). "Not just fat: the structure and function of the lipid droplet." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(3).
Gaccioli, F; Aye, IL; Roos, S; Lager, S; Ramirez, VI; Kanai, Y; Powell, TL y Jansson, T (2015). "Expression and functional characterisation of System L amino acid transporters in the human term placenta." Reprod Biol Endocrinol **13**: 57.
Gaccioli, F; Lager, S; Powell, TL y Jansson, T (2013). "Placental transport in response to altered maternal nutrition." J Dev Orig Health Dis **4**(2): 101-115.
Gaccioli, F; White, V; Capobianco, E; Powell, TL; Jawerbaum, A y Jansson, T (2013). "Maternal overweight induced by a diet with high content of saturated fat activates placental mTOR and eIF2alpha signaling and increases fetal growth in rats." Biol Reprod **89**(4): 96.
Galassetti, P (2012). "Inflammation and oxidative stress in obesity, metabolic syndrome, and diabetes." Exp Diabetes Res **2012**: 943706.
Galosy, SS y Talamantes, F (1995). "Luteotropic actions of placental lactogens at midpregnancy in the mouse." Endocrinology **136**(9): 3993-4003.
Gallou-Kabani, C; Gabory, A; Tost, J; Karimi, M; Mayeur, S; Lesage, J; Boudadi, E; Gross, MS; Taurelle, J; Vige, A; Breton, C; Reusens, B; Remacle, C; Vieau, D; Ekstrom, TJ; Jais, JP y Junien, C (2010). "Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet." PLoS One **5**(12): e14398.
Garcia, MD; Casanueva, FF; Dieguez, C y Senaris, RM (2000). "Gestational profile of leptin messenger ribonucleic acid (mRNA) content in the placenta and adipose tissue in the rat, and regulation of the mRNA levels of the leptin receptor subtypes in the hypothalamus during pregnancy and lactation." Biol Reprod **62**(3): 698-703.

Garonna, E; Botham, KM; Birdsey, GM; Randi, AM; Gonzalez-Perez, RR y Wheeler-Jones, CP (2011). "Vascular endothelial growth factor receptor-2 couples cyclo-oxygenase-2 with pro-angiogenic actions of leptin on human endothelial cells." PLoS One **6**(4): e18823.

Gavrilova, O; Haluzik, M; Matsusue, K; Cutson, JJ; Johnson, L; Dietz, KR; Nicol, CJ; Vinson, C; Gonzalez, FJ y Reitman, ML (2003). "Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass." J Biol Chem **278**(36): 34268-34276.

Ge, H; Huang, L; Pourbahrami, T y Li, C (2002). "Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo." J Biol Chem **277**(48): 45898-45903.

Geary, N y Asarian, L (2001). "Estradiol increases glucagon's satiating potency in ovariectomized rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**(4): R1290-1294.

Georgiades, P; Ferguson-Smith, AC y Burton, GJ (2002). "Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae." Placenta **23**(1): 3-19.

Gero, D y Szabo, C (2006). "Role of the peroxynitrite-poly (ADP-ribose) polymerase pathway in the pathogenesis of liver injury." Curr Pharm Des **12**(23): 2903-2910.

Ghibaudi, L; Cook, J; Farley, C; van Heek, M y Hwa, JJ (2002). "Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats." Obes Res **10**(9): 956-963.

Giannini, EG; Testa, R y Savarino, V (2005). "Liver enzyme alteration: a guide for clinicians." CMAJ **172**(3): 367-379.

Gitlin, D (1975). "Normal biology of alpha-fetoprotein." Ann N Y Acad Sci **259**: 7-16.

Green, LC; Wagner, DA; Glogowski, J; Skipper, PL; Wishnok, JS y Tannenbaum, SR (1982). "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids." Anal Biochem **126**(1): 131-138.

Griendling, KK; Sorescu, D y Ushio-Fukai, M (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." Circ Res **86**(5): 494-501.

Gross, SS y Wolin, MS (1995). "Nitric oxide: pathophysiological mechanisms." Annu Rev Physiol **57**: 737-769.

Grygiel-Gorniak, B (2014). "Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review." Nutr J **13**: 17.

Gude, NM; Roberts, CT; Kalionis, B y King, RG (2004). "Growth and function of the normal human placenta." Thromb Res **114**(5-6): 397-407.

Guerre-Millo, M; Gervois, P; Raspe, E; Madsen, L; Poulain, P; Derudas, B; Herbert, JM; Winegar, DA; Willson, TM; Fruchart, JC; Berge, RK y Staels, B (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity." J Biol Chem **275**(22): 16638-16642.

Guibourdenche, J; Tarrade, A; Laurendeau, I; Rochette-Egly, C; Chambon, P; Vidaud, M y Evain-Brion, D (2000). "Retinoids stimulate leptin synthesis and secretion in human syncytiotrophoblast." J Clin Endocrinol Metab **85**(7): 2550-2555.

Gulick, T; Cresci, S; Caira, T; Moore, DD y Kelly, DP (1994). "The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 11012-11016.

Guo, S (2014). "Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms." J Endocrinol **220**(2): T1-T23.

Gurr, M; Harwood, J y Frayn, K (2002). Lipid Biochemistry: An Introduction. Oxford, UK.

Halliwell, B (2007). "Biochemistry of oxidative stress." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1147-1150.

Hardie, DG y Pan, DA (2002). "Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase." Biochem Soc Trans **30**(Pt 6): 1064-1070.

Hardie, L; Trayhurn, P; Abramovich, D y Fowler, P (1997). "Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy." Clin Endocrinol (Oxf) **47**(1): 101-106.

Hauguel-de Mouzon, S; Lepercq, J y Catalano, P (2006). "The known and unknown of leptin in pregnancy." Am J Obstet Gynecol **194**(6): 1537-1545.

Havel, PJ (2000). "Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance." Proc Nutr Soc **59**(3): 359-371.

Hayes, EK; Lechowicz, A; Petrik, JJ; Storozhuk, Y; Paez-Parent, S; Dai, Q; Samjoo, IA; Mansell, M; Gruslin, A; Holloway, AC y Raha, S (2012). "Adverse fetal and neonatal outcomes associated with a life-long high fat diet: role of altered development of the placental vasculature." PLoS One **7**(3): e33370.

Hayes, EK; Tessier, DR; Percival, ME; Holloway, AC; Petrik, JJ; Gruslin, A y Raha, S (2014). "Trophoblast invasion and blood vessel remodeling are altered in a rat model of lifelong maternal obesity." Reprod Sci **21**(5): 648-657.
Hayward, CE; Lean, S; Sibley, CP; Jones, RL; Wareing, M; Greenwood, SL y Dilworth, MR (2016). "Placental Adaptation: What Can We Learn from Birthweight:Placental Weight Ratio?" Front Physiol **7**: 28.
Hensley, K; Robinson, KA; Gabbita, SP; Salsman, S y Floyd, RA (2000). "Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury." Free Radic Biol Med **28**(10): 1456-1462.
Henson, MC y Castracane, VD (2006). "Leptin in pregnancy: an update." Biol Reprod **74**(2): 218-229.
Herrera, E (2002). "Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn." Endocrine **19**(1): 43-55.
Herrera, E; Amusquivar, E; Lopez-Soldado, I y Ortega, H (2006). "Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer." Horm Res **65 Suppl 3**: 59-64.
Hiden, U; Glitzner, E; Hartmann, M y Desoye, G (2009). "Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies." J Anat **215**(1): 60-68.
Hiden, U; Lang, I; Ghaffari-Tabrizi, N; Gauster, M; Lang, U y Desoye, G (2009). "Insulin action on the human placental endothelium in normal and diabetic pregnancy." Curr Vasc Pharmacol **7**(4): 460-466.
Hihi, AK; Michalik, L y Wahli, W (2002). "PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives." Cell Mol Life Sci **59**(5): 790-798.
Hileman, SM; Pierroz, DD; Masuzaki, H; Bjorbaek, C; El-Haschimi, K; Banks, WA y Flier, JS (2002). "Characterizaton of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity." Endocrinology **143**(3): 775-783.
Hoggard, N; Crabtree, J; Allstaff, S; Abramovich, DR y Haggarty, P (2001). "Leptin secretion to both the maternal and fetal circulation in the ex vivo perfused human term placenta." Placenta **22**(4): 347-352.
Hoggard, N; Hunter, L; Duncan, JS; Williams, LM; Trayhurn, P y Mercer, JG (1997). "Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 11073-11078.
Hoggard, N; Hunter, L; Lea, RG; Trayhurn, P y Mercer, JG (2000). "Ontogeny of the expression of leptin and its receptor in the murine fetus and placenta." Br J Nutr **83**(3): 317-326.
Holzer, RG; Park, EJ; Li, N; Tran, H; Chen, M; Choi, C; Solinas, G y Karin, M (2011). "Saturated fatty acids induce c-Src clustering within membrane subdomains, leading to JNK activation." Cell **147**(1): 173-184.
Horton, JD; Goldstein, JL y Brown, MS (2002). "SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver." J Clin Invest **109**(9): 1125-1131.
Horton, JD; Shah, NA; Warrington, JA; Anderson, NN; Park, SW; Brown, MS y Goldstein, JL (2003). "Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12027-12032.
Hsu, SC y Huang, CJ (2006). "Reduced fat mass in rats fed a high oleic acid-rich safflower oil diet is associated with changes in expression of hepatic PPARalpha and adipose SREBP-1c-regulated genes." J Nutr **136**(7): 1779-1785.
Hussain, SP; Hofseth, LJ y Harris, CC (2003). "Radical causes of cancer." Nat Rev Cancer **3**(4): 276-285.
Iizuka, K; Bruick, RK; Liang, G; Horton, JD y Uyeda, K (2004). "Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7281-7286.
Jaeschke, H y Ramachandran, A (2011). "Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver." J Hepatol **55**(1): 227-228.
Jakimiuk, AJ; Skalba, P; Huterski, D; Tarkowski, R; Haczynski, J y Magoffin, DA (2003). "Leptin messenger ribonucleic acid (mRNA) content in the human placenta at term: relationship to levels of leptin in cord blood and placental weight." Gynecol Endocrinol **17**(4): 311-316.
Jameson, JL y Hollenberg, AN (1993). "Regulation of chorionic gonadotropin gene expression." Endocr Rev **14**(2): 203-221.
Jang, HH; Park, MY; Kim, HW; Lee, YM; Hwang, KA; Park, JH; Park, DS y Kwon, O (2012). "Black rice (Oryza sativa L.) extract attenuates hepatic steatosis in C57BL/6 J mice fed a high-fat diet via fatty acid oxidation." Nutr Metab (Lond) **9**(1): 27.

Jansson, N; Rosario, FJ; Gaccioli, F; Lager, S; Jones, HN; Roos, S; Jansson, T y Powell, TL (2013). "Activation of placental mTOR signaling and amino acid transporters in obese women giving birth to large babies." J Clin Endocrinol Metab **98**(1): 105-113.

Jansson, T (2001). "Amino acid transporters in the human placenta." Pediatr Res **49**(2): 141-147.

Jansson, T; Cetin, I; Powell, TL; Desoye, G; Radaelli, T; Ericsson, A y Sibley, CP (2006). "Placental transport and metabolism in fetal overgrowth -- a workshop report." Placenta **27 Suppl A**: S109-113.

Jansson, T y Powell, TL (2006). "IFPA 2005 Award in Placentology Lecture. Human placental transport in altered fetal growth: does the placenta function as a nutrient sensor? -- a review." Placenta **27 Suppl A**: S91-97.

Jawerbaum, A y Gonzalez, E (2005). "The role of alterations in arachidonic acid metabolism and nitric oxide homeostasis in rat models of diabetes during early pregnancy." Curr Pharm Des **11**(10): 1327-1342.

Jha, HC; von Recklinghausen, G y Zilliken, F (1985). "Inhibition of in vitro microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids." Biochem Pharmacol **34**(9): 1367-1369.

Jiang, X; Mu, D; Manabat, C; Koshy, AA; Christen, S; Tauber, MG; Vexler, ZS y Ferriero, DM (2004). "Differential vulnerability of immature murine neurons to oxygen-glucose deprivation." Exp Neurol **190**(1): 224-232.

Jin, X; Fukuda, N; Su, J; Takagi, H; Lai, Y; Lin, Z; Kanmatsuse, K; Wang, ZW y Unger, RH (2003). "Effects of leptin on endothelial function with OB-Rb gene transfer in Zucker fatty rats." Atherosclerosis **169**(2): 225-233.

Jones, HN; Woollett, LA; Barbour, N; Prasad, PD; Powell, TL y Jansson, T (2009). "High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice." FASEB J **23**(1): 271-278.

Kalhan, S y Parimi, P (2000). "Gluconeogenesis in the fetus and neonate." Semin Perinatol **24**(2): 94-106.

Kalupahana, NS; Moustaid-Moussa, N y Claycombe, KJ (2012). "Immunity as a link between obesity and insulin resistance." Mol Aspects Med **33**(1): 26-34.

Kaufmann, P; Black, S y Huppertz, B (2003). "Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia." Biol Reprod **69**(1): 1-7.

Kautzky-Willer, A y Handisurya, A (2009). "Metabolic diseases and associated complications: sex and gender matter!" Eur J Clin Invest **39**(8): 631-648.

Kawai, M; Murakami, T; Otani, S; Shima, K; Yamaguchi, M y Kishi, K (1999). "Colocalization of leptin receptor (OB-R) mRNA and placental lactogen-II in rat trophoblast cells: gestational profile of OB-R mRNA expression in placentae." Biochem Biophys Res Commun **257**(2): 425-430.

Kazantzis, M y Stahl, A (2012). "Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease." Biochim Biophys Acta **1821**(5): 852-857.

Keller, H; Givel, F; Perroud, M y Wahli, W (1995). "Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements." Mol Endocrinol **9**(7): 794-804.

Kellerer, M; Lammers, R; Fritsche, A; Strack, V; Machicao, F; Borboni, P; Ullrich, A y Haring, HU (2001). "Insulin inhibits leptin receptor signalling in HEK293 cells at the level of janus kinase-2: a potential mechanism for hyperinsulinaemia-associated leptin resistance." Diabetologia **44**(9): 1125-1132.

Kerouz, NJ; Horsch, D; Pons, S y Kahn, CR (1997). "Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (ob/ob) mouse." J Clin Invest **100**(12): 3164-3172.

Kersten, S y Wahli, W (2000). "Peroxisome proliferator activated receptor agonists." EXS **89**: 141-151.

Kim, JK; Fillmore, JJ; Chen, Y; Yu, C; Moore, IK; Pypaert, M; Lutz, EP; Kako, Y; Velez-Carrasco, W; Goldberg, IJ; Breslow, JL y Shulman, GI (2001). "Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7522-7527.

Kim, SY; Sharma, AJ; Sappenfield, W; Wilson, HG y Salihu, HM (2014). "Association of maternal body mass index, excessive weight gain, and gestational diabetes mellitus with large-for-gestational-age births." Obstet Gynecol **123**(4): 737-744.

Kimura, K; Tsuda, K; Baba, A; Kawabe, T; Boh-oka, S; Ibata, M; Moriwaki, C; Hano, T y Nishio, I (2000). "Involvement of nitric oxide in endothelium-dependent arterial relaxation by leptin." Biochem Biophys Res Commun **273**(2): 745-749.
King, JC; Butte, NF; Bronstein, MN; Kopp, LE y Lindquist, SA (1994). "Energy metabolism during pregnancy: influence of maternal energy status." Am J Clin Nutr **59**(2 Suppl): 439S-445S.
Kitade, M; Yoshiji, H; Kojima, H; Ikenaka, Y; Noguchi, R; Kaji, K; Yoshii, J; Yanase, K; Namisaki, T; Asada, K; Yamazaki, M; Tsujimoto, T; Akahane, T; Uemura, M y Fukui, H (2006). "Leptin-mediated neovascularization is a prerequisite for progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats." Hepatology **44**(4): 983-991.
Klaassen, CD y Aleksunes, LM (2010). "Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation." Pharmacol Rev **62**(1): 1-96.
Klaassen, CD y Reisman, SA (2010). "Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver." Toxicol Appl Pharmacol **244**(1): 57-65.
Klaassen, CD y Slitt, AL (2005). "Regulation of hepatic transporters by xenobiotic receptors." Curr Drug Metab **6**(4): 309-328.
Knipp, GT; Liu, B; Audus, KL; Fujii, H; Ono, T y Soares, MJ (2000). "Fatty acid transport regulatory proteins in the developing rat placenta and in trophoblast cell culture models." Placenta **21**(4): 367-375.
Kolaczynski, JW; Ohannesian, JP; Considine, RV; Marco, CC y Caro, JF (1996). "Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans." J Clin Endocrinol Metab **81**(11): 4162-4165.
Konig, J; Nies, AT; Cui, Y; Leier, I y Keppler, D (1999). "Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance." Biochim Biophys Acta **1461**(2): 377-394.
Kral, JG; Biron, S; Simard, S; Hould, FS; Lebel, S; Marceau, S y Marceau, P (2006). "Large maternal weight loss from obesity surgery prevents transmission of obesity to children who were followed for 2 to 18 years." Pediatrics **118**(6): e1644-1649.
La Cava, A y Matarese, G (2004). "The weight of leptin in immunity." Nat Rev Immunol **4**(5): 371-379.
Ladyman, SR; Fieldwick, DM y Grattan, DR (2012). "Suppression of leptin-induced hypothalamic JAK/STAT signalling and feeding response during pregnancy in the mouse." Reproduction **144**(1): 83-90.
Lee, QP y Juchau, MR (1994). "Dysmorphogenic effects of nitric oxide (NO) and NO-synthase inhibition: studies with intra-amniotic injections of sodium nitroprusside and NG-monomethyl-L-arginine." Teratology **49**(6): 452-464.
Lee, Y; Yu, X; Gonzales, F; Mangelsdorf, DJ; Wang, MY; Richardson, C; Witters, LA y Unger, RH (2002). "PPAR alpha is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11848-11853.
Lefebvre, P; Chinetti, G; Fruchart, JC y Staels, B (2006). "Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis." J Clin Invest **116**(3): 571-580.
Lepercq, J; Challier, JC; Guerre-Millo, M; Cauzac, M; Vidal, H y Hauguel-de Mouzon, S (2001). "Prenatal leptin production: evidence that fetal adipose tissue produces leptin." J Clin Endocrinol Metab **86**(6): 2409-2413.
LeRoith, D; Werner, H; Beitner-Johnson, D y Roberts, CT, Jr. (1995). "Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor." Endocr Rev **16**(2): 143-163.
Lewis, DF; Jacobs, MN; Dickins, M y Lake, BG (2002). "Molecular modelling of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) from human, rat and mouse, based on homology with the human PPAR gamma crystal structure." Toxicol In Vitro **16**(3): 275-280.
Lewis, GF (1997). "Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production." Curr Opin Lipidol **8**(3): 146-153.
Lewis, GF; Carpentier, A; Adeli, K y Giacca, A (2002). "Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes." Endocr Rev **23**(2): 201-229.
Li, Z; Ceccarini, G; Eisenstein, M; Tan, K y Friedman, JM (2013). "Phenotypic effects of an induced mutation of the ObRa isoform of the leptin receptor." Mol Metab **2**(4): 364-375.
Liang, C; DeCourcy, K y Prater, MR (2010). "High-saturated-fat diet induces gestational diabetes and placental vasculopathy in C57BL/6 mice." Metabolism **59**(7): 943-950.

Liapakis, IE; Anagnostoulis, S; Karayiannakis, AJ; Korkolis, DP; Lambropoulou, M; Arnaud, E y Simopoulos, CE (2008). "Recombinant leptin administration improves early angiogenesis in full-thickness skin flaps: an experimental study." In Vivo **22**(2): 247-252.

Lin, J; Barb, CR; Matteri, RL; Kraeling, RR; Chen, X; Meinersmann, RJ y Rampacek, GB (2000). "Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig." Domest Anim Endocrinol **19**(1): 53-61.

Lindegaard, ML; Olivecrona, G; Christoffersen, C; Kratky, D; Hannibal, J; Petersen, BL; Zechner, R; Damm, P y Nielsen, LB (2005). "Endothelial and lipoprotein lipases in human and mouse placenta." J Lipid Res **46**(11): 2339-2346.

Linnemann, K; Malek, A; Sager, R; Blum, WF; Schneider, H y Fusch, C (2000). "Leptin production and release in the dually in vitro perfused human placenta." J Clin Endocrinol Metab **85**(11): 4298-4301.

Livak, KJ y Schmittgen, TD (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Lolmede, K; Duffaut, C; Zakaroff-Girard, A y Bouloumie, A (2011). "Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders." Diabetes Metab **37**(4): 283-290.

Lopez-Luna, P; Munoz, T y Herrera, E (1986). "Body fat in pregnant rats at mid- and late-gestation." Life Sci **39**(15): 1389-1393.

Lucero, D; Miksztowicz, V; Macri, V; Lopez, GH; Friedman, S; Berg, G; Zago, V y Schreier, L (2015). "Overproduction of altered VLDL in an insulin-resistance rat model: Influence of SREBP-1c and PPAR-alpha." Clin Investig Arterioscler **27**(4): 167-174.

Lyall, F (2002). "The human placental bed revisited." Placenta **23**(8-9): 555-562.

Ma, Q (2013). "Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity." Annu Rev Pharmacol Toxicol **53**: 401-426.

Maffei, M; Halaas, J; Ravussin, E; Pratley, RE; Lee, GH; Zhang, Y; Fei, H; Kim, S; Lallone, R; Ranganathan, S y et al. (1995). "Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects." Nat Med **1**(11): 1155-1161.

Magnusson-Olsson, AL; Hamark, B; Ericsson, A; Wennergren, M; Jansson, T y Powell, TL (2006). "Gestational and hormonal regulation of human placental lipoprotein lipase." J Lipid Res **47**(11): 2551-2561.

Malarkey, DE; Johnson, K; Ryan, L; Boorman, G y Maronpot, RR (2005). "New insights into functional aspects of liver morphology." Toxicol Pathol **33**(1): 27-34.

Malassine, A; Frendo, JL y Evain-Brion, D (2003). "A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model." Hum Reprod Update **9**(6): 531-539.

Manderson, JG; Patterson, CC; Hadden, DR; Traub, AI; Leslie, H y McCance, DR (2003). "Leptin concentrations in maternal serum and cord blood in diabetic and nondiabetic pregnancy." Am J Obstet Gynecol **188**(5): 1326-1332.

Mannaerts, GP; Van Veldhoven, PP y Casteels, M (2000). "Peroxisomal lipid degradation via beta- and alpha-oxidation in mammals." Cell Biochem Biophys **32 Spring**: 73-87.

Mantzoros, CS; Magkos, F; Brinkoetter, M; Sienkiewicz, E; Dardeno, TA; Kim, SY; Hamnvik, OP y Koniaris, A (2011). "Leptin in human physiology and pathophysiology." Am J Physiol Endocrinol Metab **301**(4): E567-584.

Margetic, S; Gazzola, C; Pegg, GG y Hill, RA (2002). "Leptin: a review of its peripheral actions and interactions." Int J Obes Relat Metab Disord **26**(11): 1407-1433.

Marseglia, L; Manti, S; D'Angelo, G; Nicotera, A; Parisi, E; Di Rosa, G; Gitto, E y Arrigo, T (2014). "Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases." Int J Mol Sci **16**(1): 378-400.

Martinez, N; Kurtz, M; Capobianco, E; Higa, R; White, V y Jawerbaum, A (2011). "PPARalpha agonists regulate lipid metabolism and nitric oxide production and prevent placental overgrowth in term placentas from diabetic rats." J Mol Endocrinol **47**(1): 1-12.

Martinez, N; White, V; Kurtz, M; Higa, R; Capobianco, E y Jawerbaum, A (2011). "Activation of the nuclear receptor PPARalpha regulates lipid metabolism in foetal liver from diabetic rats: implications in diabetes-induced foetal overgrowth." Diabetes Metab Res Rev **27**(1): 35-46.

Maymo, JL; Perez Perez, A; Gambino, Y; Calvo, JC; Sanchez-Margalet, V y Varone, CL (2011). "Review: Leptin gene expression in the placenta--regulation of a key hormone in trophoblast proliferation and survival." Placenta **32 Suppl 2**: S146-153.

Mazzucco, MB; Higa, R; Capobianco, E; Kurtz, M; Jawerbaum, A y White, V (2013). "Saturated fat-rich diet increases fetal lipids and modulates LPL and leptin receptor expression in rat placentas." J Endocrinol **217**(3): 303-315.
McAlister, ED y Van Vugt, DA (2004). "Effect of leptin administration versus re-feeding on hypothalamic neuropeptide gene expression in fasted male rats." Can J Physiol Pharmacol **82**(12): 1128-1134.
McGarry, JD; Mannaerts, GP y Foster, DW (1977). "A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis." J Clin Invest **60**(1): 265-270.
McGarry, JD; Robles-Valdes, C y Foster, DW (1975). "Role of carnitine in hepatic ketogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(11): 4385-4388.
McLaughlin, CL; Tou, JS; Rogan, GJ y Baile, CA (1991). "Full amino acid sequence of centrally administered NPY required for maximal food intake response." Physiol Behav **49**(3): 521-526.
Mei, L; Tang, Y; Li, M; Yang, P; Liu, Z; Yuan, J y Zheng, P (2015). "Co-Administration of Cholesterol-Lowering Probiotics and Anthraquinone from Cassia obtusifolia L. Ameliorate Non-Alcoholic Fatty Liver." PLoS One **10**(9): e0138078.
Merkel, M; Weinstock, PH; Chajek-Shaul, T; Radner, H; Yin, B; Breslow, JL y Goldberg, IJ (1998). "Lipoprotein lipase expression exclusively in liver. A mouse model for metabolism in the neonatal period and during cachexia." J Clin Invest **102**(5): 893-901.
Minokoshi, Y; Alquier, T; Furukawa, N; Kim, YB; Lee, A; Xue, B; Mu, J; Foufelle, F; Ferre, P; Birnbaum, MJ; Stuck, BJ y Kahn, BB (2004). "AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus." Nature **428**(6982): 569-574.
Minokoshi, Y; Kim, YB; Peroni, OD; Fryer, LG; Muller, C; Carling, D y Kahn, BB (2002). "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nature **415**(6869): 339-343.
Minsker, DH; MacDonald, JS; Robertson, RT y Bokelman, DL (1983). "Mevalonate supplementation in pregnant rats suppresses the teratogenicity of mevinolinic acid, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase." Teratology **28**(3): 449-456.
Misra, VK; Trudeau, S y Perni, U (2011). "Maternal serum lipids during pregnancy and infant birth weight: the influence of prepregnancy BMI." Obesity (Silver Spring) **19**(7): 1476-1481.
Moller, DE; Yokota, A; Caro, JF y Flier, JS (1989). "Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man." Mol Endocrinol **3**(8): 1263-1269.
Moncada, S; Palmer, RM y Higgs, EA (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." Pharmacol Rev **43**(2): 109-142.
Moncada, S; Radomski, MW y Palmer, RM (1988). "Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function." Biochem Pharmacol **37**(13): 2495-2501.
Mosthaf, L; Grako, K; Dull, TJ; Coussens, L; Ullrich, A y McClain, DA (1990). "Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing." EMBO J **9**(8): 2409-2413.
Mota, M; Banini, BA; Cazanave, SC y Sanyal, AJ (2016). "Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease." Metabolism **65**(8): 1049-1061.
Mousiolis, AV; Kollia, P; Skentou, C y Messinis, IE (2012). "Effects of leptin on the expression of fatty acid-binding proteins in human placental cell cultures." Mol Med Rep **5**(2): 497-502.
Muhlhausler, BS; Duffield, JA y McMillen, IC (2007). "Increased maternal nutrition increases leptin expression in perirenal and subcutaneous adipose tissue in the postnatal lamb." Endocrinology **148**(12): 6157-6163.
Muoio, DM y Lynis Dohm, G (2002). "Peripheral metabolic actions of leptin." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **16**(4): 653-666.
Murakami, T; Yamashita, T; Iida, M; Kuwajima, M y Shima, K (1997). "A short form of leptin receptor performs signal transduction." Biochem Biophys Res Commun **231**(1): 26-29.
Myatt, L (2010). "Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta." Placenta **31 Suppl**: S66-69.
Myatt, L; Brewer, A y Brockman, DE (1991). "The action of nitric oxide in the perfused human fetal-placental circulation." Am J Obstet Gynecol **164**(2): 687-692.

Myers, MG, Jr. y Simerly, RB (2010). "The neuroendocrinology and neuroscience of energy balance." Front Neuroendocrinol **31**(1): 1-3.
Mystkowski, P y Schwartz, MW (2000). "Gonadal steroids and energy homeostasis in the leptin era." Nutrition **16**(10): 937-946.
Nguyen, P; Leray, V; Diez, M; Serisier, S; Le Bloc'h, J; Siliart, B y Dumon, H (2008). "Liver lipid metabolism." J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) **92**(3): 272-283.
Niculescu, MD y Lupu, DS (2009). "High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development." Int J Dev Neurosci **27**(7): 627-633.
Niswender, KD y Magnuson, MA (2007). "Obesity and the beta cell: lessons from leptin." J Clin Invest **117**(10): 2753-2756.
Nordberg, J y Arner, ES (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." Free Radic Biol Med **31**(11): 1287-1312.
Norwitz, ER; Schust, DJ y Fisher, SJ (2001). "Implantation and the survival of early pregnancy." N Engl J Med **345**(19): 1400-1408.
Novaro, V; Gonzalez, E; Jawerbaum, A; Rettori, V; Canteros, G y Gimeno, MF (1997). "Nitric oxide synthase regulation during embryonic implantation." Reprod Fertil Dev **9**(5): 557-564.
Nunez, SB; Medin, JA; Braissant, O; Kemp, L; Wahli, W; Ozato, K y Segars, JH (1997). "Retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor activate an estrogen responsive gene independent of the estrogen receptor." Mol Cell Endocrinol **127**(1): 27-40.
Odegaard, JI y Chawla, A (2011). "Alternative macrophage activation and metabolism." Annu Rev Pathol **6**: 275-297.
Okada, K; Shoda, J; Taguchi, K; Maher, JM; Ishizaki, K; Inoue, Y; Ohtsuki, M; Goto, N; Sugimoto, H; Utsunomiya, H; Oda, K; Warabi, E; Ishii, T y Yamamoto, M (2009). "Nrf2 counteracts cholestatic liver injury via stimulation of hepatic defense systems." Biochem Biophys Res Commun **389**(3): 431-436.
Oliveira, E; Fagundes, AT; Alves, SB; Pazos-Moura, CC; Moura, EG; Passos, MC y Lisboa, PC (2007). "Chronic leptin treatment inhibits liver mitochondrial alpha-glycerol-beta-phosphate dehydrogenase in euthyroid rats." Horm Metab Res **39**(12): 867-870.
Ong, KK; Ahmed, ML; Sherriff, A; Woods, KA; Watts, A; Golding, J y Dunger, DB (1999). "Cord blood leptin is associated with size at birth and predicts infancy weight gain in humans. ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood." J Clin Endocrinol Metab **84**(3): 1145-1148.
Ornellas, F; Souza-Mello, V; Mandarim-de-Lacerda, CA y Aguila, MB (2015). "Programming of obesity and comorbidities in the progeny: lessons from a model of diet-induced obese parents." PLoS One **10**(4): e0124737.
Ozmen, A; Unek, G; Kipmen-Korgun, D; Cetinkaya, B; Avcil, Z y Korgun, ET (2015). "Glucocorticoid exposure altered angiogenic factor expression via Akt/mTOR pathway in rat placenta." Ann Anat **198**: 34-40.
Palmer, RM; Ashton, DS y Moncada, S (1988). "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." Nature **333**(6174): 664-666.
Palou, M; Priego, T; Sanchez, J; Palou, A y Pico, C (2010). "Sexual dimorphism in the lasting effects of moderate caloric restriction during gestation on energy homeostasis in rats is related with fetal programming of insulin and leptin resistance." Nutr Metab (Lond) **7**: 69.
Panadero, M; Bocos, C y Herrera, E (2006). "Relationship between lipoprotein lipase and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha expression in rat liver during development." J Physiol Biochem **62**(3): 189-198.
Panchenko, PE; Voisin, S; Jouin, M; Jouneau, L; Prezelin, A; Lecoutre, S; Breton, C; Jammes, H; Junien, C y Gabory, A (2016). "Expression of epigenetic machinery genes is sensitive to maternal obesity and weight loss in relation to fetal growth in mice." Clin Epigenetics **8**: 22.
Pandini, G; Frasca, F; Mineo, R; Sciacca, L; Vigneri, R y Belfiore, A (2002). "Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved." J Biol Chem **277**(42): 39684-39695.
Pardina, E; Baena-Fustegueras, JA; Llamas, R; Catalan, R; Galard, R; Lecube, A; Fort, JM; Llobera, M; Allende, H; Vargas, V y Peinado-Onsurbe, J (2009). "Lipoprotein lipase expression in livers of morbidly obese patients could be responsible for liver steatosis." Obes Surg **19**(5): 608-616.

Park, HK y Ahima, RS (2014). "Leptin signaling." F1000Prime Rep **6**: 73.
Park, HY; Kwon, HM; Lim, HJ; Hong, BK; Lee, JY; Park, BE; Jang, Y; Cho, SY y Kim, HS (2001). "Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro." Exp Mol Med **33**(2): 95-102.
Pautz, A; Art, J; Hahn, S; Nowag, S; Voss, C y Kleinert, H (2010). "Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase." Nitric Oxide **23**(2): 75-93.
Paz-Filho, G; Mastronardi, C; Franco, CB; Wang, KB; Wong, ML y Licinio, J (2012). "Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications." Arq Bras Endocrinol Metabol **56**(9): 597-607.
Pelleymounter, MA; Cullen, MJ; Baker, MB; Hecht, R; Winters, D; Boone, T y Collins, F (1995). "Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice." Science **269**(5223): 540-543.
Perez-Perez, A; Maymo, J; Gambino, Y; Duenas, JL; Goberna, R; Varone, C y Sanchez-Margalet, V (2009). "Leptin stimulates protein synthesis-activating translation machinery in human trophoblastic cells." Biol Reprod **81**(5): 826-832.
Perez-Perez, A; Maymo, J; Gambino, Y; Guadix, P; Duenas, JL; Varone, C y Sanchez-Margalet, V (2013). "Insulin enhances leptin expression in human trophoblastic cells." Biol Reprod **89**(1): 20.
Perez-Perez, A; Sanchez-Jimenez, F; Maymo, J; Duenas, JL; Varone, C y Sanchez-Margalet, V (2015). "Role of leptin in female reproduction." Clin Chem Lab Med **53**(1): 15-28.
Postic, C; Dentin, R y Girard, J (2004). "Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis." Diabetes Metab **30**(5): 398-408.
Postic, C y Girard, J (2008). "Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice." J Clin Invest **118**(3): 829-838.
Pyper, SR; Viswakarma, N; Yu, S y Reddy, JK (2010). "PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer." Nucl Recept Signal **8**: e002.
Qiao, L; Yoo, HS; Madon, A; Kinney, B; Hay, WW, Jr. y Shao, J (2012). "Adiponectin enhances mouse fetal fat deposition." Diabetes **61**(12): 3199-3207.
Radi, R; Beckman, JS; Bush, KM y Freeman, BA (1991). "Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide." Arch Biochem Biophys **288**(2): 481-487.
Rakhshandehroo, M; Sanderson, LM; Matilainen, M; Stienstra, R; Carlberg, C; de Groot, PJ; Muller, M y Kersten, S (2007). "Comprehensive analysis of PPARalpha-dependent regulation of hepatic lipid metabolism by expression profiling." PPAR Res **2007**: 26839.
Randle, PJ (1986). "Fuel selection in animals." Biochem Soc Trans **14**(5): 799-806.
Rando, G y Wahli, W (2011). "Sex differences in nuclear receptor-regulated liver metabolic pathways." Biochim Biophys Acta **1812**(8): 964-973.
Rathore, N; John, S; Kale, M y Bhatnagar, D (1998). "Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues." Pharmacol Res **38**(4): 297-303.
Redgrave, TG (1970). "Formation of cholesteryl ester-rich particulate lipid during metabolism of chylomicrons." J Clin Invest **49**(3): 465-471.
Reid, G; Wielinga, P; Zelcer, N; De Haas, M; Van Deemter, L; Wijnholds, J; Balzarini, J y Borst, P (2003). "Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5." Mol Pharmacol **63**(5): 1094-1103.
Repetto, M; Maziere, JC; Citadelle, D; Dupuis, R; Meier, M; Biade, S; Quiec, D y Roux, C (1990). "Teratogenic effect of the cholesterol synthesis inhibitor AY 9944 on rat embryos in vitro." Teratology **42**(6): 611-618.
Reynolds, CM; Vickers, MH; Harrison, CJ; Segovia, SA y Gray, C (2015). "Maternal high fat and/or salt consumption induces sex-specific inflammatory and nutrient transport in the rat placenta." Physiol Rep **3**(5).
Riccardi, G; Giacco, R y Rivellese, AA (2004). "Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome." Clin Nutr **23**(4): 447-456.
Roberts, CK y Sindhu, KK (2009). "Oxidative stress and metabolic syndrome." Life Sci **84**(21-22): 705-712.

Rodriguez-Cruz, M; Gonzalez, RS; Maldonado, J; Lopez-Alarcon, M y Bernabe-Garcia, M (2016). "The effect of gestational age on expression of genes involved in uptake, trafficking and synthesis of fatty acids in the rat placenta." Gene **591**(2): 403-410.

Roemmich, JN; Clark, PA; Berr, SS; Mai, V; Mantzoros, CS; Flier, JS; Weltman, A y Rogol, AD (1998). "Gender differences in leptin levels during puberty are related to the subcutaneous fat depot and sex steroids." Am J Physiol **275**(3 Pt 1): E543-551.

Rosario, FJ; Kanai, Y; Powell, TL y Jansson, T (2015). "Increased placental nutrient transport in a novel mouse model of maternal obesity with fetal overgrowth." Obesity (Silver Spring) **23**(8): 1663-1670.

Rosario, FJ; Powell, TL y Jansson, T (2016). "Activation of placental insulin and mTOR signaling in a mouse model of maternal obesity associated with fetal overgrowth." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **310**(1): R87-93.

Rosenbaum, M; Nicolson, M; Hirsch, J; Heymsfield, SB; Gallagher, D; Chu, F y Leibel, RL (1996). "Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin." J Clin Endocrinol Metab **81**(9): 3424-3427.

Rui, L (2014). "Energy metabolism in the liver." Compr Physiol **4**(1): 177-197.

Ryu, MH y Cha, YS (2003). "The effects of a high-fat or high-sucrose diet on serum lipid profiles, hepatic acyl-CoA synthetase, carnitine palmitoyltransferase-I, and the acetyl-CoA carboxylase mRNA levels in rats." J Biochem Mol Biol **36**(3): 312-318.

Sagawa, N; Yura, S; Itoh, H; Mise, H; Kakui, K; Korita, D; Takemura, M; Nuamah, MA; Ogawa, Y; Masuzaki, H; Nakao, K y Fujii, S (2002). "Role of leptin in pregnancy--a review." Placenta **23 Suppl A**: S80-86.

Sainsbury, A; Cusin, I; Doyle, P; Rohner-Jeanrenaud, F y Jeanrenaud, B (1996). "Intracerebroventricular administration of neuropeptide Y to normal rats increases obese gene expression in white adipose tissue." Diabetologia **39**(3): 353-356.

Saladin, R; De Vos, P; Guerre-Millo, M; Leturque, A; Girard, J; Staels, B y Auwerx, J (1995). "Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration." Nature **377**(6549): 527-529.

Sampath, H y Ntambi, JM (2005). "The fate and intermediary metabolism of stearic acid." Lipids **40**(12): 1187-1191.

Sampath, H y Ntambi, JM (2005). "Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism." Annu Rev Nutr **25**: 317-340.

Sampey, BP; Vanhoose, AM; Winfield, HM; Freemerman, AJ; Muehlbauer, MJ; Fueger, PT; Newgard, CB y Makowski, L (2011). "Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet." Obesity (Silver Spring) **19**(6): 1109-1117.

Samuel, VT; Petersen, KF y Shulman, GI (2010). "Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism." Lancet **375**(9733): 2267-2277.

Samuel, VT y Shulman, GI (2012). "Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links." Cell **148**(5): 852-871.

Scarpace, PJ y Zhang, Y (2007). "Elevated leptin: consequence or cause of obesity?" Front Biosci **12**: 3531-3544.

Schumann, U y Subramani, S (2008). "Special delivery from mitochondria to peroxisomes." Trends Cell Biol **18**(6): 253-256.

Seino, S y Bell, GI (1989). "Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA." Biochem Biophys Res Commun **159**(1): 312-316.

Sengupta, S; Peterson, TR y Sabatini, DM (2010). "Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress." Mol Cell **40**(2): 310-322.

Seo, S; Guo, DF; Bugge, K; Morgan, DA; Rahmouni, K y Sheffield, VC (2009). "Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling." Hum Mol Genet **18**(7): 1323-1331.

Sferruzzi-Perri, AN y Camm, EJ (2016). "The Programming Power of the Placenta." Front Physiol **7**: 33.

Sferruzzi-Perri, AN; Owens, JA; Standen, P; Taylor, RL; Robinson, JS y Roberts, CT (2007). "Early pregnancy maternal endocrine insulin-like growth factor I programs the placenta for increased functional capacity throughout gestation." Endocrinology **148**(9): 4362-4370.

Shankar, K; Harrell, A; Liu, X; Gilchrist, JM; Ronis, MJ y Badger, TM (2008). "Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **294**(2): R528-538.

Shankar, K; Kang, P; Harrell, A; Zhong, Y; Marecki, JC; Ronis, MJ y Badger, TM (2010). "Maternal overweight programs insulin and adiponectin signaling in the offspring." Endocrinology **151**(6): 2577-2589.
Shelby, MK y Klaassen, CD (2006). "Induction of rat UDP-glucuronosyltransferases in liver and duodenum by microsomal enzyme inducers that activate various transcriptional pathways." Drug Metab Dispos **34**(10): 1772-1778.
Shin, S; Wakabayashi, J; Yates, MS; Wakabayashi, N; Dolan, PM; Aja, S; Liby, KT; Sporn, MB; Yamamoto, M y Kensler, TW (2009). "Role of Nrf2 in prevention of high-fat diet-induced obesity by synthetic triterpenoid CDDO-imidazolide." Eur J Pharmacol **620**(1-3): 138-144.
Shiva, S; Brookes, PS; Patel, RP; Anderson, PG y Darley-Usmar, VM (2001). "Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7212-7217.
Shoelson, SE; Lee, J y Goldfine, AB (2006). "Inflammation and insulin resistance." J Clin Invest **116**(7): 1793-1801.
Sidorkina, O; Espey, MG; Miranda, KM; Wink, DA y Laval, J (2003). "Inhibition of poly(ADP-RIBOSE) polymerase (PARP) by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species." Free Radic Biol Med **35**(11): 1431-1438.
Sierra-Honigmann, MR; Nath, AK; Murakami, C; Garcia-Cardena, G; Papapetropoulos, A; Sessa, WC; Madge, LA; Schechner, JS; Schwabb, MB; Polverini, PJ y Flores-Riveros, JR (1998). "Biological action of leptin as an angiogenic factor." Science **281**(5383): 1683-1686.
Sies, H y Cadenas, E (1985). "Oxidative stress: damage to intact cells and organs." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **311**(1152): 617-631.
Sinha, MK; Opentanova, I; Ohannesian, JP; Kolaczynski, JW; Heiman, ML; Hale, J; Becker, GW; Bowsher, RR; Stephens, TW y Caro, JF (1996). "Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting." J Clin Invest **98**(6): 1277-1282.
Sivitz, WI; Walsh, S; Morgan, D; Donohoue, P; Haynes, W y Leibel, RL (1998). "Plasma leptin in diabetic and insulin-treated diabetic and normal rats." Metabolism **47**(5): 584-591.
Smith, JT y Waddell, BJ (2003). "Leptin distribution and metabolism in the pregnant rat: transplacental leptin passage increases in late gestation but is reduced by excess glucocorticoids." Endocrinology **144**(7): 3024-3030.
Soares, MJ; Chakraborty, D; Karim Rumi, MA; Konno, T y Renaud, SJ (2012). "Rat placentation: an experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface." Placenta **33**(4): 233-243.
Softic, S; Kirby, M; Berger, NG; Shroyer, NF; Woods, SC y Kohli, R (2012). "Insulin concentration modulates hepatic lipid accumulation in mice in part via transcriptional regulation of fatty acid transport proteins." PLoS One **7**(6): e38952.
Sohlstrom, A; Kabir, N; Sadurskis, A y Forsum, E (1994). "Body composition and fat distribution during the first 2 weeks of gestation in ad lib.-fed and energy-restricted rats." Br J Nutr **71**(3): 317-333.
Soriano, FG; Lorigados, CB; Pacher, P y Szabo, C (2011). "Effects of a potent peroxynitrite decomposition catalyst in murine models of endotoxemia and sepsis." Shock **35**(6): 560-566.
Spiteller, G (2006). "Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products." Free Radic Biol Med **41**(3): 362-387.
Srivastava, RA; Jahagirdar, R; Azhar, S; Sharma, S y Bisgaier, CL (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha selective ligand reduces adiposity, improves insulin sensitivity and inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice." Mol Cell Biochem **285**(1-2): 35-50.
Stadtman, ER y Levine, RL (2003). "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins." Amino Acids **25**(3-4): 207-218.
Stefanovic-Racic, M; Perdomo, G; Mantell, BS; Sipula, IJ; Brown, NF y O'Doherty, RM (2008). "A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels." Am J Physiol Endocrinol Metab **294**(5): E969-977.
Stefulj, J; Panzenboeck, U; Becker, T; Hirschmugl, B; Schweinzer, C; Lang, I; Marsche, G; Sadjak, A; Lang, U; Desoye, G y Wadsack, C (2009). "Human endothelial cells of the placental barrier efficiently deliver cholesterol to the fetal circulation via ABCA1 and ABCG1." Circ Res **104**(5): 600-608.

Storch, J y Corsico, B (2008). "The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins." Annu Rev Nutr **28**: 73-95.
Suematsu, N; Tsutsui, H; Wen, J; Kang, D; Ikeuchi, M; Ide, T; Hayashidani, S; Shiomi, T; Kubota, T; Hamasaki, N y Takeshita, A (2003). "Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes." Circulation **107**(10): 1418-1423.
Szabo, C (2003). "Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity." Toxicol Lett **140-141**: 105-112.
Szabo, C y Modis, K (2010). "Pathophysiological roles of peroxynitrite in circulatory shock." Shock **34 Suppl 1**: 4-14.
Taguchi, A; Wartschow, LM y White, MF (2007). "Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis." Science **317**(5836): 369-372.
Tartaglia, LA (1997). "The leptin receptor." J Biol Chem **272**(10): 6093-6096.
Taylor, PD y Poston, L (2007). "Developmental programming of obesity in mammals." Exp Physiol **92**(2): 287-298.
Tcherepanova, I; Puigserver, P; Norris, JD; Spiegelman, BM y McDonnell, DP (2000). "Modulation of estrogen receptor-alpha transcriptional activity by the coactivator PGC-1." J Biol Chem **275**(21): 16302-16308.
Tchernof, A; Calles-Escandon, J; Sites, CK y Poehlman, ET (1998). "Menopause, central body fatness, and insulin resistance: effects of hormone-replacement therapy." Coron Artery Dis **9**(8): 503-511.
Thaler, CD y Epel, D (2003). "Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya." Curr Pharm Des **9**(5): 399-409.
Toda, N y Okamura, T (2013). "Obesity impairs vasodilatation and blood flow increase mediated by endothelial nitric oxide: an overview." J Clin Pharmacol **53**(12): 1228-1239.
Towler, MC y Hardie, DG (2007). "AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling." Circ Res **100**(3): 328-341.
Tsai, M; Asakawa, A; Amitani, H y Inui, A (2012). "Stimulation of leptin secretion by insulin." Indian J Endocrinol Metab **16**(Suppl 3): S543-548.
Tsuda, K y Nishio, I (2004). "Leptin and nitric oxide production in normotensive and hypertensive men." Obes Res **12**(8): 1223-1237.
Tu, H; Kastin, AJ; Hsuchou, H y Pan, W (2008). "Soluble receptor inhibits leptin transport." J Cell Physiol **214**(2): 301-305.
Tugwood, JD; Issemann, I; Anderson, RG; Bundell, KR; McPheat, WL y Green, S (1992). "The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene." EMBO J **11**(2): 433-439.
Turpaev, KT (2002). "Reactive oxygen species and regulation of gene expression." Biochemistry (Mosc) **67**(3): 281-292.
Unger, RH (2004). "The hyperleptinemia of obesity-regulator of caloric surpluses." Cell **117**(2): 145-146.
Valdecantos, MP; Prieto-Hontoria, PL; Pardo, V; Modol, T; Santamaria, B; Weber, M; Herrero, L; Serra, D; Muntane, J; Cuadrado, A; Moreno-Aliaga, MJ; Alfredo Martinez, J y Valverde, AM (2015). "Essential role of Nrf2 in the protective effect of lipoic acid against lipoapoptosis in hepatocytes." Free Radic Biol Med **84**: 263-278.
Varga, T; Czimmerer, Z y Nagy, L (2011). "PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation." Biochim Biophys Acta **1812**(8): 1007-1022.
Vila, L; Roglans, N; Alegret, M; Sanchez, RM; Vazquez-Carrera, M y Laguna, JC (2008). "Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism." Hepatology **48**(5): 1506-1516.
Villamor, E y Cnattingius, S (2006). "Interpregnancy weight change and risk of adverse pregnancy outcomes: a population-based study." Lancet **368**(9542): 1164-1170.
Virtue, S y Vidal-Puig, A (2010). "Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective." Biochim Biophys Acta **1801**(3): 338-349.
Vitseva, OI; Tanriverdi, K; Tchkonia, TT; Kirkland, JL; McDonnell, ME; Apovian, CM; Freedman, J y Gokce, N (2008). "Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue." Obesity (Silver Spring) **16**(5): 932-937.

von Versen-Hoynck, F; Rajakumar, A; Parrott, MS y Powers, RW (2009). "Leptin affects system A amino acid transport activity in the human placenta: evidence for STAT3 dependent mechanisms." Placenta **30**(4): 361-367.

Wadsack, C; Hammer, A; Levak-Frank, S; Desoye, G; Kozarsky, KF; Hirschmugl, B; Sattler, W y Malle, E (2003). "Selective cholesteryl ester uptake from high density lipoprotein by human first trimester and term villous trophoblast cells." Placenta **24**(2-3): 131-143.

Wahli, W y Michalik, L (2012). "PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation." Trends Endocrinol Metab **23**(7): 351-363.

Wang, MY; Lee, Y y Unger, RH (1999). "Novel form of lipolysis induced by leptin." J Biol Chem **274**(25): 17541-17544.

Wein, S; Ukropec, J; Gasperikova, D; Klimes, I y Sebokova, E (2007). "Concerted action of leptin in regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle and liver." Exp Clin Endocrinol Diabetes **115**(4): 244-251.

White, V; Gonzalez, E; Capobianco, E; Pustovrh, C; Martinez, N; Higa, R; Baier, M y Jawerbaum, A (2006). "Leptin modulates nitric oxide production and lipid metabolism in human placenta." Reprod Fertil Dev **18**(4): 425-432.

White, V; Gonzalez, E; Capobianco, E; Pustovrh, C; Sonez, C; Romanini, MC y Jawerbaum, A (2004). "Modulatory effect of leptin on nitric oxide production and lipid metabolism in term placental tissues from control and streptozotocin-induced diabetic rats." Reprod Fertil Dev **16**(3): 363-372.

Winder, WW y Hardie, DG (1999). "AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes." Am J Physiol **277**(1 Pt 1): E1-10.

Woollett, LA (2011). "Review: Transport of maternal cholesterol to the fetal circulation." Placenta **32 Suppl 2**: S218-221.

Wu, YM; Luo, HW; Kou, H; Wen, YX; Shen, L; Pei, LG; Zhou, J; Zhang, YZ y Wang, H (2015). "Prenatal caffeine exposure induced a lower level of fetal blood leptin mainly via placental mechanism." Toxicol Appl Pharmacol **289**(1): 109-116.

Xia, Y; Roman, LJ; Masters, BS y Zweier, JL (1998). "Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain." J Biol Chem **273**(35): 22635-22639.

Yamaguchi, Y; Flier, JS; Benecke, H; Ransil, BJ y Moller, DE (1993). "Ligand-binding properties of the two isoforms of the human insulin receptor." Endocrinology **132**(3): 1132-1138.

Yamaguchi, Y; Flier, JS; Yokota, A; Benecke, H; Backer, JM y Moller, DE (1991). "Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells." Endocrinology **129**(4): 2058-2066.

Yamashita, H; Takenoshita, M; Sakurai, M; Bruick, RK; Henzel, WJ; Shillinglaw, W; Arnot, D y Uyeda, K (2001). "A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9116-9121.

Ye, JM; Doyle, PJ; Iglesias, MA; Watson, DG; Cooney, GJ y Kraegen, EW (2001). "Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat-fed rats: comparison with PPAR-gamma activation." Diabetes **50**(2): 411-417.

Yecies, JL; Zhang, HH; Menon, S; Liu, S; Yecies, D; Lipovsky, AI; Gorgun, C; Kwiatkowski, DJ; Hotamisligil, GS; Lee, CH y Manning, BD (2011). "Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways." Cell Metab **14**(1): 21-32.

Yoon, M (2009). "The role of PPARalpha in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPARalpha actions." Pharmacol Res **60**(3): 151-159.

Yoon, M (2010). "PPARalpha in Obesity: Sex Difference and Estrogen Involvement." PPAR Res **2010**.

Zabolotny, JM; Bence-Hanulec, KK; Stricker-Krongrad, A; Haj, F; Wang, Y; Minokoshi, Y; Kim, YB; Elmquist, JK; Tartaglia, LA; Kahn, BB y Neel, BG (2002). "PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo." Dev Cell **2**(4): 489-495.

Zelcer, N; Reid, G; Wielinga, P; Kuil, A; van der Heijden, I; Schuetz, JD y Borst, P (2003). "Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4)." Biochem J **371**(Pt 2): 361-367.

Zhang, Y; Proenca, R; Maffei, M; Barone, M; Leopold, L y Friedman, JM (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-432.

Zhao, Y; Peng, L; Yang, LC; Xu, XD; Li, WJ; Luo, XM y Jin, X (2015). "Wedelolactone Regulates Lipid Metabolism and Improves Hepatic Steatosis Partly by AMPK Activation and Up-Regulation of Expression of PPARalpha/LPL and LDLR." PLoS One **10**(7): e0132720.

Zhou, Y y Rui, L (2013). "Leptin signaling and leptin resistance." Front Med **7**(2): 207-222.

Zhu, MJ; Ma, Y; Long, NM; Du, M y Ford, SP (2010). "Maternal obesity markedly increases placental fatty acid transporter expression and fetal blood triglycerides at midgestation in the ewe." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **299**(5): R1224-1231.

Zhu, Y; Kan, L; Qi, C; Kanwar, YS; Yeldandi, AV; Rao, MS y Reddy, JK (2000). "Isolation and characterization of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) interacting protein (PRIP) as a coactivator for PPAR." J Biol Chem **275**(18): 13510-13516.