



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

# **Susceptibilidad al desarrollo de insulino-resistencia en un modelo de programación fetal por estrés gestacional**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica.

**Lic. Yamila Raquel Juárez**

Directores de tesis: Dra. Adriana Laura Burgueño

Dr. Juan Carlos Calvo

Consejero de estudios: Dr. Mario Galigniana

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED, UCA-CONICET).

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2019

## **Susceptibilidad al desarrollo de insulino-resistencia en un modelo de programación fetal por estrés gestacional**

### **Resumen**

Las condiciones adversas sufridas en periodos tempranos de la vida pueden producir alteraciones perdurables en la fisiología y el metabolismo, modificando el riesgo de desarrollar diversas enfermedades en la adultez. Dado el importante impacto que tiene el ambiente intrauterino en la vida de un individuo, se ha postulado que el estrés prenatal tendría un efecto negativo sobre el desarrollo de las crías, en parte como resultado de la exposición del feto a altos niveles de glucocorticoides.

En el presente trabajo nos propusimos estudiar en dos cepas de ratones, C57BL/6J y BALB/c, si la exposición a estrés prenatal (por restricción del movimiento) y el posterior desafío de la ingesta de una dieta rica en grasas modifica la fisiología de las crías aumentando su susceptibilidad a desarrollar alteraciones metabólicas.

Encontramos que la exposición a estrés prenatal, ya sea conjuntamente con la ingesta de dieta grasa o no, produjo el desarrollo de sobrepeso, alteraciones en las curvas de respuesta a la glucosa e insulina, niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos más elevados y cambios en la expresión de genes relacionados con la inflamación y la insulino-resistencia.

En conclusión, observamos efectos metabólicos deletéreos causados por el estrés prenatal sobre la salud de las crías adultas. Algunos de los cuales fueron puestos en evidencia o exacerbados con la ingesta de una dieta rica en grasa.

Palabras clave: PROGRAMACIÓN FETAL- ESTRÉS PRENATAL- DIETA GRASA- METABOLISMO- INSULINO-RESISTENCIA.

## **Susceptibility to Insulin – Resistance Development Induced by Prenatal Stress in a Fetal Programming Model**

### **Abstract**

Adverse environmental conditions during early life can produce long-lasting physiological and metabolic alterations, increasing the risk of developing metabolic diseases in adulthood. Given that the intrauterine environment has a huge impact on an individual's life, it has been proposed that prenatal stress would have negative effects on the development of the offspring. This is partially as a result of the exposure of the fetus to high levels of glucocorticoids.

In the present work our aim was to study, in C57BL/6J and BALB/c mice, whether or not the exposure to prenatal stress (due to movement restriction) and the subsequent challenge with the intake of a high-fat diet modifies the offspring's physiology, making them more prone to develop metabolic disorders.

We observed that exposure to prenatal stress, either with the intake of a high-fat diet or not, produced the development of excessive weight and alterations in response to glucose and insulin. Furthermore, these conditions increased cholesterol and triglycerides levels and changed the expression of genes related to inflammation and insulin resistance.

In conclusion, we observed deleterious metabolic effects due to prenatal stress on the health of the adult offspring. Certain effects were highlighted or exacerbated with the intake of a high-fat diet.

**Key words: FETAL PROGRAMMING - PRENATAL STRESS – HIGH-FAT DIET - METABOLISM – INSULIN-RESISTANCE.**

**AGRADECIMIENTOS**

Son muchos, tengan paciencia.

Mi comienzo de doctorado fue en otro tema y otro grupo de trabajo, entonces primero quiero agradecer a JC, mi director, por presentarme a la beca CONICET y por permitirme cambiar el rumbo cuando el tema no funcionó y continuar dirigiendome.

No tengo palabras que me alcancen para agradecer a Ana quien me adoptó, nuevamente, en su laboratorio para que trabaje con Adri.

Adri, sos la jefa que todos los becarios quieren tener: me enseñaste una montón de cosas, siempre respondiste a mis inquietudes, me diste la libertad para poder realizar una estadía en el exterior, ¡pipeteaste codo a codo conmigo! Y sobretodo siempre supiste guiarme y lidiar con mi carácter un “poquito” fuerte.

A mis compañeros Emi y Andrés. Emi te extrañé mucho este año, gracias por ayudarme cada vez que te pregunté algo, gracias por las charlas, gracias por todo el tiempo que compartimos. Andrés mi compañero de módulo, espalda con espalda, gracias por acompañarme con el canto cada vez que escuchábamos aspen jaja, gracias por bancarme con mis dilemas con el vikingo, y gracias por las miles historias que me diste en este último año! Jajajaja material para rato! Mari, Miriam y Marian gracias por ayudarme cada vez que lo necesité y darme nuevas ideas para mi tesis. Pau y Sofi, compartimos poco pero siempre me alentaron y me dieron apoyo y crearon un ambiente tranquilo cuando estaba en pleno proceso de escritura, gracias!!!

A la gente del BIOMED, ¡somos un instituto chico pero de corazón grande! Gracias a todos los integrantes de este instituto, hicieron mis días más felices y divertidos. Eze, Anita y Pachi más que compañeros son amigos, ¡gracias!.

El IByME me dio muchos amigos y conocí gente divina, gracias a todos ellos, al grupo “juntada”: Eugene, Luli, Celeschi, Pau, Cin, Anto, Mati, Maurito, Nicky B, Payes, Angelita. Y acá quiero hacer un apartado especial, para una persona que es incondicional, que estoy agradecida por haberla conocido, que me banco mil, que me prestó su casa cada vez que se iba para que yo no tuviera tanto viaje al lab. Con ella “tindereabamos” acostadas en la cama, ¡que manera de divertirnos por favor! Con ella compartí miles de risas, ¡¡¡¡gracias a vos LU!!!! Soy muy feliz por haberte conocido, porque formes parte de mi vida y seamos amigas.

En mi vida hay dos colorados muy especiales, uno lo conocí por mi paso en el IByME y a pesar de que lo conocía de exactas (y no me caía muy bien) terminó por sorprenderme y ser uno de mis mejores amigos, gracias a vos Nico Dalton te quiero banda. Al poco tiempo de ingresar al BIOMED, estaba trabajando en la computadora y entró al labo, para mi sorpresa: otra colorada. Se presentó como Karina y me preguntó

si podíamos chatear por google, fue al mejor estilo “hola, ¿quierés ser mi amiga?” jajajaja, de ahí en más se volvió mi back-up, mi amiga y somos el claro ejemplo de que por más que dos personas piensen muy distinto sobre un tema, aún así, se puede convivir y tener una amistad te quiero banda colorada!

A Ole por aceptarme como pasante en su laboratorio, a mis amigos del lab en copen: Michele y Lisa sin ustedes mi estadía no hubiera sido la misma. A toda la gente del piso Luke G, Luke C, Konstantina, Vickie, Carmen, Saad, Line, Lasse, Shuwn, Huan, Chaorui, Alex, Kristian, Gems.

Gracias al CONICET por darme el sustento económico en estos 5 años, gracias Boehringer Ingelheim fonds por darme la beca para realizar la estadía en Dinamarca.

A mis amigos de siempre, a los que conozco desde que tengo 8 años más o menos, porque siempre siempre estuvieron presentes y aún hoy siguen estando: gracias Lala, Mauito, Merita y Solcito (mi Twin). A mis amigos más recientes Javi y Ka, gracias por las charlas filosóficas de la vida, gracias por estar siempre.

A mi tía, a mi prima, a mi tío gracias por estar siempre y darme mucho amor y cariño.

A mi hermano, que es un rebelde pero cuando está en modo bueno es el mejor de los hermanos.

A Max, quien fue la persona que más cerca de mí estuvo, con quien compartí todo este tiempo, mi amigo, mi compañero. Gracias, a pesar de las idas y vueltas, a pesar de las peleas y reconciliaciones.

A dos personas que fueron, son y serán mis pilares: mis abuelos Angélica y Jorge. Por más que no estén físicamente con nosotros viven en mí y los amo con todo mi corazón, gracias por todo lo que me enseñaron, gracias por darme valores, gracias por enseñarme el significado de la perseverancia y la constancia, gracias por alentarme a estudiar, gracias por darme una infancia y adolescencia envidiable, ¡pucha que se los extraña!

Y todo esto no hubiera sido posible sin el patrocinio de mi ¡¡MADRE!! Que no solo me da un techo donde vivir, sino que siempre está para mí, ayudándome en todo lo que puede, dándome sostén psicológico en épocas duras, y que por sobretodas las cosas, la más importante es que me dio la VIDA, ¡gracias Ma! Espero que estés orgullosa de mi, a pesar de toooooodas las cosas que vos más que nadie conoce de mí jajajaja.

GRACIAS, LOS QUIERO MUCHO A TODOS

YAm

## ABREVIATURAS

<b>11<math>\beta</math>-HSD1</b> , 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1	<b>PIBF</b> , factor bloqueador inducido por progesterona
<b>11<math>\beta</math>-HSD2</b> , 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2	<b>PPAR<math>\alpha</math></b> , receptor del proliferador activado de peroxisoma $\alpha$
<b>ABC</b> , área bajo la curva	<b>PPAR<math>\gamma</math></b> , receptor del proliferador activado de peroxisoma $\gamma$
<b>ACTH</b> , corticotrofina	<b>PPRE</b> , elementos de respuesta de PPAR
<b>AVP</b> , vasopresina	<b>PVN</b> , neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo
<b>CRH</b> , hormona liberadora de corticotrofina	<b>RAAS</b> , sistema renina-angiotensina-aldosterona
<b>CRH-R</b> , receptor de la hormona liberadora de corticotrofina	<b>RCIU</b> , restricción del crecimiento intrauterino
<b>DAG</b> , diacilglicerol	<b>RXR<math>s</math></b> , receptor X retinoides
<b>DBT</b> , diabetes	<b>SCN</b> , núcleo supraquiasmático
<b>DBT2</b> , diabetes tipo 2	<b>SD</b> , ratas Sprague-Dawley
<b>DC</b> , dieta control	<b>SIRT1</b> , sirtuina 1
<b>DG</b> , dieta grasa	<b>SIRT3</b> , sirtuina 3
<b>DOHaD</b> , “Developmental Origins of Health and Disease” teoría de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad	<b>SM</b> , síndrome metabólico
<b>EP</b> , estresado prenatalmente/ estrés prenatal	<b>SNC</b> , sistema nervioso central
<b>FFAs</b> , ácidos grasos libres	<b>SNPs</b> , polimorfismo de nucleótido único
<b>FOXO1</b> , proteína “forkhead box O”	<b>SOCS3</b> , supresor de la señal de citoquina 3
<b>GCs</b> , glucocorticoides	<b>TAB<math>v</math></b> , tejido adiposo blanco visceral
<b>GLUT4</b> , transportador de glucosa tipo 4	<b>TAM</b> , tejido adiposo marron
<b>GR</b> , receptor de glucocorticoides	<b>TNF<math>\alpha</math></b> , factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>HPA</b> , hipotálamo-hipófisis-adrenal	<b>TSI</b> , test de sensibilidad a la insulina
<b>IL-1<math>\beta</math></b> , interleuquina 1 $\beta$	<b>TTG</b> , test de tolerancia a la glucosa
<b>IL-4</b> , interleuquina 4	
<b>IMC</b> , índice de masa corporal	
<b>IR</b> , insulino-resistencia	
<b>IRS-1</b> , sustrato del receptor de insulina 1	
<b>MCs</b> , mineralocorticoides	
<b>MR</b> , receptor de mineralocorticoides	
<b>NAD</b> , nicotinamida adenina dinucleótido	
<b>NADP</b> , nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	
<b>NEP</b> , no estresado prenatalmente	
<b>OMS</b> , organización mundial de la salud	
<b>PGC1-<math>\alpha</math> IsoA</b> , coactivador 1 $\alpha$ de PPAR isoforma A	
<b>PGC1-<math>\alpha</math></b> , coactivador 1 $\alpha$ de PPAR	

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	10
ESTRÉS.....	10
<i>El eje hipotálamo-pituitaria-adrenal</i> .....	11
<i>Glucocorticoides</i> .....	14
ESTRÉS GESTACIONAL.....	15
<i>Enzima 11<math>\beta</math>-hidroxiesteroide deshidrogenasa</i> .....	16
TEORÍA DE LA PROGRAMACIÓN FETAL .....	18
<i>Alteraciones epigenéticas</i> .....	20
SÍNDROME METABÓLICO .....	22
<i>Obesidad</i> .....	24
<i>Dislipemias</i> .....	25
<i>Hipertrigliceridemia</i> .....	25
<i>Bajos niveles de colesterol HDL</i> .....	25
<i>Hiperglucemia y resistencia a la insulina</i> .....	26
TEJIDO ADIPOSO .....	26
<i>Inflamación</i> .....	27
<i>Adipoquinas</i> .....	28
<i>Leptina</i> .....	28
<i>Adiponectina</i> .....	29
<i>Resistina</i> .....	30
<i>Proteínas “forkhead box O”</i> .....	30
<i>Receptor del proliferador activado de peroxisoma</i> .....	31
<i>Las sirtuínas</i> .....	31
HÍGADO .....	32
<i>Inflamación</i> .....	33
<i>Coactivador 1 <math>\alpha</math> del receptor del proliferador activado de peroxisoma</i> .....	34
<i>PPAR<math>\alpha</math></i> .....	34
<i>Supresores de la señal de citoquinas</i> .....	35
<i>Sirt 1 y 3</i> .....	35
MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	36
<i>Transportador de glucosa tipo 4</i> .....	36
VARIACIONES EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS Y A LA DIETA .....	37
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	40
HIPÓTESIS .....	40
OBJETIVOS .....	40
<i>Objetivos específicos</i> .....	40
MATERIALES Y MÉTODOS .....	43
ANIMALES .....	43
MODELO DE ESTRÉS PRENATAL .....	43
<i>Estrés por inmovilización</i> .....	43

<i>Preparación de la dieta rica en grasas</i> .....	44
<b>DETERMINACIONES FISIOLÓGICAS</b> .....	45
<i>Test de tolerancia a la glucosa</i> .....	45
<i>Test de sensibilidad a la insulina</i> .....	46
<b>DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES</b> .....	46
<i>Sacrificio de los animales</i> .....	46
<i>Determinaciones bioquímicas</i> .....	47
<i>Determinación de los niveles de colesterol total y triglicéridos</i> .....	47
<i>Determinación de los niveles de insulina por ELISA</i> .....	47
<i>Determinación de los niveles de corticosterona</i> .....	47
<i>Determinaciones moleculares</i> .....	48
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	51
<b>RESULTADOS</b> .....	53
<b>PARTE IA: CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE ESTRÉS PRENATAL A NIVEL FISIOLÓGICO</b> .....	53
<i>Peso al destete</i> .....	53
<i>Peso corporal desde la 4<sup>ta</sup> hasta la 28<sup>va</sup> semana de vida</i> .....	54
<i>Peso del hígado</i> .....	57
<i>Peso relativo del tejido adiposo abdominal</i> .....	58
<i>Curva de tolerancia a la glucosa</i> .....	58
<i>Test de sensibilidad a la insulina</i> .....	60
<i>Insulina plasmática</i> .....	61
<i>Colesterol total</i> .....	62
<i>Triglicéridos</i> .....	62
<i>Corticosterona</i> .....	63
<b>PARTE IB: EFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL A NIVEL MOLECULAR</b> ...	64
<b>TEJIDO ADIPOSO</b> .....	64
<i>Genes relacionados con la inflamación: IL-1<math>\beta</math> y TNF-<math>\alpha</math></i> .....	64
<i>Adipoquinas</i> .....	65
<i>Genes relacionados con el metabolismo energético: FOXO1 y PPAR-<math>\gamma</math></i> .....	67
<i>Gen relacionado con la acción de la insulina: SIRT1</i> .....	69
<b>HÍGADO</b> .....	69
<i>Genes relacionados con la inflamación: IL-1<math>\beta</math> e IL-4</i> .....	69
<i>Genes relacionados con el metabolismo energético: PGC1-<math>\alpha</math> y PPAR-<math>\alpha</math></i> .....	71
<i>Genes relacionados con la acción de la insulina: SOCS3, SIRT1 y SIRT3</i> ....	73
<b>MÚSCULO ESQUELÉTICO</b> .....	75
<i>GLUT4</i> .....	75
<b>PARTE IIA: CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE ESTRÉS PRENATAL Y EL CONSUMO DE DIETA GRASA A NIVEL FISIOLÓGICO</b> .....	76
<i>Peso corporal desde la 4<sup>ta</sup> hasta la 28<sup>va</sup> semana de vida</i> .....	76
<i>Peso bruto y relativo del hígado</i> .....	80
<i>Peso relativo del tejido adiposo abdominal</i> .....	82
<i>Curva de tolerancia a la glucosa</i> .....	83



<i>Test de sensibilidad a la insulina</i> .....	84
<i>Insulina plasmática</i> .....	87
<i>Colesterol total</i> .....	88
<i>Triglicéridos</i> .....	89
<i>Corticosterona</i> .....	90
<b>PARTE IIB: EFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL Y EL CONSUMO DE DIETA GRASA A NIVEL MOLECULAR</b> .....	91
<b>TEJIDO ADIPOSO</b> .....	91
<i>Genes relacionados con la inflamación: IL-1<math>\beta</math> y TNF-<math>\alpha</math></i> .....	91
<i>Adipoquinas</i> .....	93
<i>Genes relacionados con el metabolismo energético: FOXO1 y PPAR-<math>\gamma</math></i> .....	96
<i>Gen relacionado con la acción de la insulina: SIRT1</i> .....	98
<b>HÍGADO</b> .....	99
<i>Genes relacionados con la inflamación: IL-1<math>\beta</math> e IL-4</i> .....	99
<i>Genes relacionados con el metabolismo energético: PGC1-<math>\alpha</math> y PPAR-<math>\alpha</math></i> .....	101
<i>Genes relacionados con la acción de la insulina: SOCS3, SIRT1 y SIRT3</i> ...	104
<b>MÚSCULO ESQUELÉTICO</b> .....	107
<i>GLUT4</i> .....	107
<b>DISCUSIÓN</b> .....	110
<b>Metabolismo glucídico y lipídico</b> .....	113
<b>Tejido adiposo</b> .....	115
<b>Hígado</b> .....	120
<b>Músculo esquelético</b> .....	124
<b>CONCLUSIONES</b> .....	127
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	133

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

### ESTRÉS

El estrés es la respuesta no específica del cuerpo a la demanda de cambio, de cualquier índole. Es decir, es la respuesta a la alteración de la homeostasis del organismo, siendo la homeostasis el mantenimiento de los parámetros fisiológicos vitales de un organismo dentro de un rango estrecho <sup>1</sup>. Los estresores pueden ser definidos como eventos o circunstancias que promueven el estrés. Entonces, el estrés no necesariamente es una condición patológica del organismo. Aquí, el concepto de alostasis <sup>2,3</sup> es importante para entender las diferentes respuestas al estrés, dependiendo del individuo, y el consecuente desarrollo de desórdenes relacionados a los estresores. La alostasis es definida como el proceso adaptativo para mantener activamente la homeostasis frente al cambio. Una característica de la alostasis es la habilidad de montar una respuesta rápida y fuerte luego de la experiencia de estresores específicos. Entonces, mantener la estabilidad frente al cambio es un proceso fundamental, a través del cual todos los organismos se ajustan activamente a distintos eventos tanto predictivos como no. Los mediadores de la alostasis, como las hormonas adrenales, los neurotransmisores y las citoquinas, producen efectos que son adaptativos a corto plazo pero que pueden dañar al organismo si no cesan <sup>4</sup>.

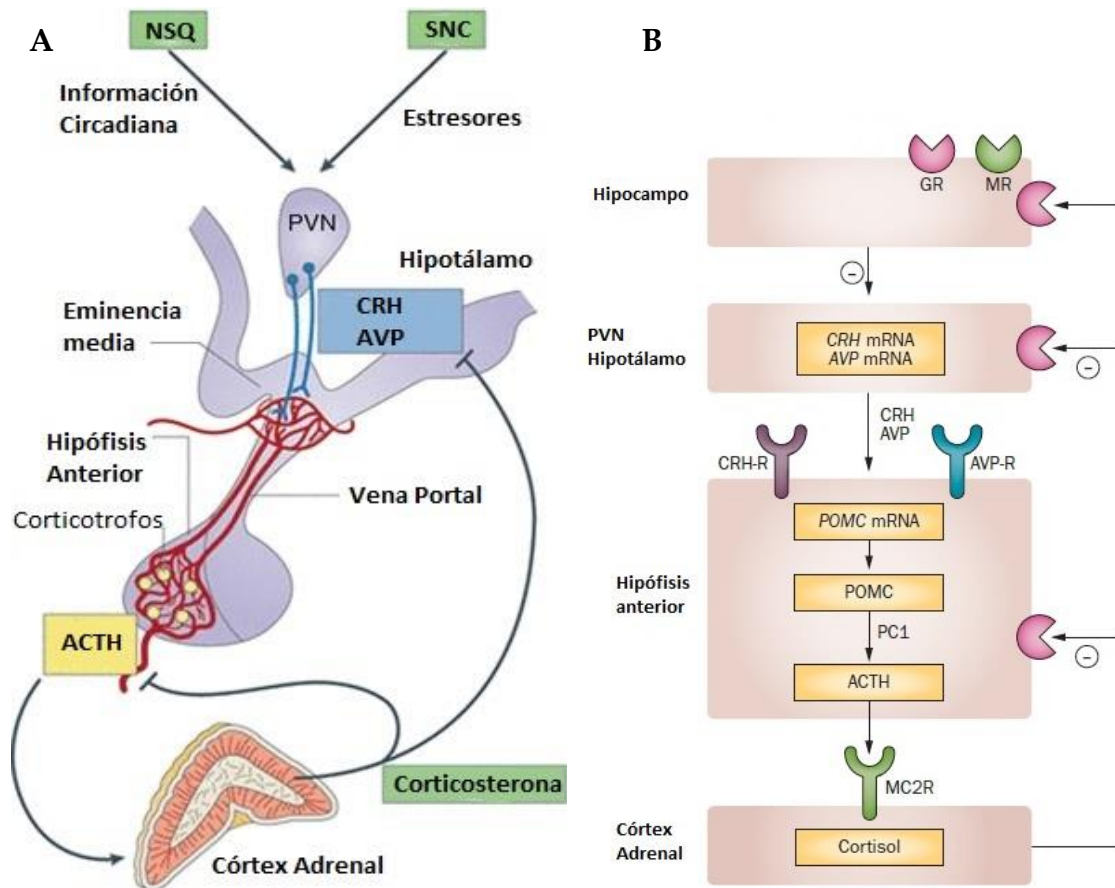
Todos los procesos adaptativos puestos en marcha por el organismo, tienen un costo potencial para el mismo, cuando la alostasis es requerida de modo muy frecuente o es manejada de manera ineficiente; este costo es denominado "carga alostática". En otras palabras, mientras la alostasis es el proceso de adaptación del organismo a los cambios, la carga alostática es el precio que el organismo debe pagar por ser forzado a adaptarse a situaciones adversas (físicas o psicológicas). Los resultados secundarios a largo plazo y patológicos de la carga alostática se pueden evidenciar en el sistema nervioso central, en la conducta, en el sistema cardiovascular, en el sistema inmune y en el metabolismo. Entonces, la carga alostática constituye un factor de vulnerabilidad para el desarrollo de patologías en los sistemas antes nombrados. Por lo tanto, la respuesta al estrés no es dañina o patológica *per se*, pero cuando un estímulo estresor es prolongado y sostenido en el tiempo, puede afectar la homeostasis e, incluso, puede poner en peligro la salud del individuo <sup>5,6</sup>. Frecuentemente, suele

denominarse a este tipo de respuesta sostenida, crónica y dañina como *distrés*. En la literatura encontramos muchos ejemplos del accionar negativo de la respuesta al estrés. Por ejemplo, el estrés ha sido implicado en la iniciación y evolución de desórdenes psiquiátricos específicos como la depresión y la ansiedad generalizada <sup>7</sup>, también se evidenció la relación entre estrés y diferentes trastornos inmunes <sup>8</sup>. Asimismo, se lo ha postulado como un factor de riesgo para el desarrollo del síndrome metabólico <sup>9</sup>.

### *El eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA)*

El eje HPA se encarga de regular la producción y secreción de corticoesteroides (glucocorticoides y mineralocorticoides) (figura 1). Las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) sintetizan la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y vasopresina (AVP). Estas hormonas, a su vez, estimulan a la adenohipófisis (o pituitaria anterior) para que libere corticotrofina (ACTH), que promueve la producción y secreción de cortisol en la corteza de la médula adrenal (o corticosterona en el caso de los roedores) <sup>10</sup>. El cortisol es la hormona responsable de la modulación final del eje HPA a través de la activación de los receptores de glucocorticoides (GR) y de mineralocorticoides (MR) en el hipotálamo, y a través de GR en el PVN y la adenohipófisis. Un aumento en los niveles de glucocorticoides (GCs) y/o de mineralocorticoides (MCs) en estos sitios, da como resultado una inhibición de la actividad del eje HPA (a causa de la retroalimentación negativa ejercida por las mismas hormonas). Por el contrario, una disminución en los niveles de estas hormonas atenúa la retroalimentación negativa, produciendo un incremento de la actividad del eje HPA <sup>11</sup>.

El eje HPA tiene un papel fundamental en la regulación de los sistemas cardiovascular, metabólico, reproductivo y neurológico; una desregulación del eje está asociada con numerosas enfermedades crónicas incluyendo el síndrome metabólico y un número importante de enfermedades psiquiátricas <sup>12</sup>.



**Figura 1: El eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA).** (A) Representación esquemática del eje HPA: el hipotálamo recibe señales circadianas desde el núcleo supraquiasmático (NSQ) y señales de estrés desde el sistema nervioso central (SNC). PVN, núcleo paraventricular; CRH hormona liberadora de corticotrofina; AVP vasopresina; ACTH hormona corticotrofina. <sup>13</sup>. (B) Mecanismo molecular del eje HPA: Las neuronas hipotalámicas (PVN) sintetizan y secretan la hormona CRH que interacciona con su receptor (CRH-R) presente en los corticotrofos de la adenohipófisis, estimulando la liberación de ACTH. ACTH, finalmente, actúa sobre la corteza de la glándula adrenal, interaccionando con su receptor (receptor de mineralocorticoide MR), promoviendo la síntesis y liberación de cortisol. El cortisol estimula distintos tejidos blanco para cumplir distintas funciones y, además, ejerce una retroalimentación negativa interaccionando con los receptores de glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR) ubicados en la adenohipófisis, el hipotálamo y el hipocampo. Modificado de <sup>12</sup>.

El eje HPA tiene un papel protagónico en la respuesta al estrés, que puede clasificarse como estrés agudo o crónico:

- a) El estrés agudo, lleva a una respuesta al estrés dirigida por el eje HPA y, una vez que cesa la amenaza, todos los mecanismos encendidos por el estresor se apagan <sup>1</sup>. En los seres humanos, la respuesta al estrés agudo es iniciada por la percepción de estresores (conscientes o no) y comunicados al cuerpo a través del sistema nervioso central (SNC), despertando una serie de respuestas conjuntas neuronales y hormonales

<sup>14</sup>. Los principales actores hormonales incluyen a las catecolaminas y las hormonas del eje HPA. El aumento de los niveles de las hormonas circulantes provoca cambios y respuestas fisiológicas en la mayoría de los órganos.

La cascada molecular que continúa al reconocimiento de una situación estresante y pone al organismo en alerta, es básicamente la misma en todos los vertebrados incluyendo a los humanos. La primer oleada <sup>15</sup> que ocurre dentro de los primeros segundos involucra, entre otras cosas, la secreción aumentada de catecolaminas como la adrenalina y la noradrenalina desde el sistema nervioso simpático (SNS); la liberación de CRH desde el hipotálamo a la circulación portal y, unos pocos segundos después, la secreción de ACTH por parte de la hipófisis. Luego de este pico de secreción hormonal los niveles de estas hormonas disminuyen.

La hipófisis, a su vez, secreta prolactina (PRL) y también ocurre una liberación de glucagon almacenado en el hígado para aumentar los niveles de glucosa en sangre. Una oleada secundaria posterior, involucra a las hormonas esteroideas. En el transcurso de minutos, la secreción de GCs es estimulada y la secreción de esteroides gonadales declina generalizadamente.

El estrés agudo mediado por GCs es sumamente ventajoso para el animal, para el "fitness" del mismo y se caracteriza porque, a partir de un nivel basal bajo o normal de GCs, aparece un estímulo o una perturbación que ocasiona un pico en la secreción de GCs y, a su vez, este pico genera la retroalimentación negativa por lo que el eje HPA se apaga y el sistema se recupera rápidamente. Entonces, ocurre un aumento transitorio de GCs que, luego, baja y por esta razón se dice que es un estrés agudo mediado por GCs. Este tipo de estrés asociado al "fitness" o la supervivencia del animal, es positivo porque envía señales a distintas partes del organismo para sobrellevar y superar esa situación de estrés y, luego, todos los sistemas, principalmente el eje HPA, vuelven a la normalidad.

- b) Por otra parte, el estrés crónico se asocia con efectos negativos. Lo que ocurre en este caso es que el eje HPA se activa partiendo de un basal de GCs un poco más alto. Cuando el estresor se mantiene en forma persistente, la activación del eje HPA es mayor, se hace sostenida, y comienzan a fallar los mecanismos de retroalimentación negativa, ya que

los GCs aumentan tanto que inhiben a sus propios receptores. Por lo tanto, existe una desregulación del eje HPA con diversas consecuencias. Durante un estrés agudo, la retroalimentación negativa mantiene la homeostasis del eje HPA mientras que, frente al estrés crónico, esta retroalimentación negativa se rompe <sup>16</sup>. El estrés crónico es la fase deletérea que afecta funciones que ya no solo sirven para derivar energía, sino que empieza a afectar a los órganos, se inhibe la síntesis proteica, puede producir hemorragias (úlceras gástricas), induce la osteoporosis porque inhibe la síntesis de la matriz celular, etc.

### *Glucocorticoides (GCs)*

Los GCs son hormonas esteroideas secretadas por la glándula adrenal, que tienen un papel fundamental en la regulación de la homeostasis y la respuesta adaptativa al estrés físico y psicológico. Estas hormonas ejercen sus principales funciones cuando se unen a su receptor, GR, normalmente de localización citosólica, con translocación nuclear. El GR pertenece a la superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción para modular, de manera positiva o negativa, la expresión de diversos genes. Los GR se encuentran expresados en la mayoría de las células, pero su afinidad por los GCs es 10 veces menor que la que tiene el MR. Entonces, cuando existen concentraciones basales de GCs, estas moléculas se unen con alta afinidad al MR, mientras que, para que interactúen con el GR se necesitan concentraciones observadas durante el estrés <sup>17</sup>.

Entonces, el efecto biológico de los GCs no está determinado sólo por su concentración sino, también, por la sensibilidad del tejido a la acción de la hormona, lo que dependerá del número y variante del receptor expresada en el tejido.

Por ejemplo, en momentos en que la demanda energética es alta, los GCs actúan en los tejidos periféricos donde alteran el metabolismo y promueven respuestas para cubrir la demanda energética. De esta manera, los GCs promueven la gluconeogénesis hepática, la proteólisis en el músculo esquelético y, también, pueden actuar en el tejido adiposo estimulando la lipólisis <sup>17</sup>.

Los GCs juegan un papel fundamental durante el desarrollo de un organismo, ya que regulan la expresión génica que es necesaria para el crecimiento y maduración normal.

## ESTRÉS GESTACIONAL

El estrés gestacional o prenatal (EP) es el estrés que sufre la madre durante la preñez. Se ha observado que el estrés prenatal induce cambios, exacerbando el perfil de comportamiento de tipo ansioso y desregula los ejes noradrenérgicos y HPA, después de una exposición a estrés en la adultez <sup>18-21</sup>. Asimismo, se ha descrito que el estrés fisiológico durante la tercera semana de gestación disminuye la función de los macrófagos y los neutrófilos, la citotoxicidad de células NK de sangre y bazo, y la resistencia a inducción de tumores en la cría <sup>22,23</sup>.

Se ha sugerido que la exposición al estrés prenatal causa cambios estables de larga duración en los sistemas de respuesta centrales y periféricos. Así, se vio una posterior vulnerabilidad a exposiciones a estrés subsecuentes <sup>24,25</sup>. Además, se ha investigado el efecto de una nueva exposición a estrés en ratas estresadas prenatalmente y se encontró que los controles se recuperan, luego de 5 días, de las alteraciones inducidas por la situación de estrés, no así los animales sometidos a estrés prenatal <sup>26</sup>. Esta evidencia demostraría que los individuos expuestos prenatalmente al estrés, responderían con desventajas frente a una nueva situación de estrés.

En contraposición, la modulación del sistema fisiológico por estímulos del ambiente durante la ontogenia, fue propuesto como un mecanismo que favorece la adaptación de la cría en desarrollo, al ambiente post parto <sup>27</sup>. Se propuso que el feto, durante su vida intrauterina, se adaptaría a los estímulos que recibe de tal forma que modificaría su fisiología para responder convenientemente a ese estímulo en su vida adulta. En este sentido, se ha demostrado que el estrés prenatal atenúa los cambios morfológicos inducidos por exposición a estrés crónico en animales adultos <sup>28</sup>.

El eje HPA es altamente susceptible a los efectos de los factores ambientales y puede ser modulado durante la vida intrauterina. En este sentido, algunos autores observaron que animales estresados prenatalmente, a menudo, muestran mayor secreción de corticosterona basal en comparación con animales control <sup>29</sup>, mientras que otros autores no observaron diferencias <sup>30</sup>. Incluso, en un modelo de conflicto social, se vió una disminución de la concentración de corticosterona en animales estresados prenatalmente, los autores señalan que esto se debería a una menor actividad del eje HPA <sup>26</sup>.



Asimismo, se han reportado resultados disímiles frente a una nueva exposición a estrés. Maccari y colaboradores describen una secreción prolongada de corticosterona en ratas estresadas prenatalmente al ser sometidas a estrés agudo por restricción del movimiento <sup>31</sup>. Sin embargo, en otro trabajo, no se encontraron diferencias en los niveles de corticosterona en animales estresados prenatalmente, frente a una situación de estrés agudo en la vida adulta, pero sí cuando los animales fueron sometidos a estrés crónico <sup>32</sup>.

Debido a la controversia en los resultados y a los distintos tipos de estresores y tiempos utilizados, se ha postulado que la naturaleza del estresor juega un papel importante en los efectos del estrés prenatal sobre la fisiología y el comportamiento de la cría en la vida adulta.

### ***Enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 $\beta$ -HSD)***

La enzima 11 $\beta$ -HSD interconvierte en seres humanos, el cortisol a su forma inactiva la cortisona y, corticosterona a 11 $\beta$ -dehidrocorticosterona en roedores <sup>33</sup>. Se encuentra localizada ampliamente en diversos tejidos y modula las concentraciones locales de los GCs que interactúan con su receptor. Existen dos isoformas de la enzima 11 $\beta$ -HSD.

- a) La 11 $\beta$ -HSD tipo 1 es una enzima con actividad bidireccional, pero *in-vivo* actúa principalmente como una óxido-reductasa usando NADP(H) como cofactor, para generar cortisol o corticosterona (forma activa de los GCs). Su mayor actividad se registra en el hígado.
- b) La 11 $\beta$ -HSD tipo 2 actúa de manera unidireccional como una NAD-deshidrogenasa, inactivando el cortisol o la corticosterona <sup>34</sup>. Los tejidos en los que se ve mayor actividad de esta isoforma es en los riñones y la placenta <sup>33</sup>.

En el curso de una preñez normal, los niveles de GCs maternos son marcadamente elevados al compararlos con los que se encuentran en la circulación fetal. Esto se debe a la acción de la 11 $\beta$ -HSD2 placentaria, que actúa como una barrera para prevenir una acción inapropiada de los GCs durante el desarrollo fetal <sup>35</sup>, inactivando los GCs maternos. Numerosos estudios mostraron que la inhibición de esta enzima durante la preñez ocasiona que la descendencia presente bajo peso al nacer y, además, desarrolle hipertensión e intolerancia a la glucosa en la adultez <sup>36-38</sup>. También produce el cambio en ciertas marcas epigenéticas (programación) en el eje HPA aumentando su actividad y conductas del tipo ansiolíticas <sup>39</sup>.

En el mismo sentido, numerosos estudios en seres humanos asociaron el estrés prenatal con el bajo peso al nacer, el mayor riesgo de un nacimiento prematuro y un desarrollo neurológico deteriorado en la vida temprana <sup>40</sup>. La exposición a eventos traumáticos en madres gestantes, también fue asociada con elevadas tasas de restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), desregulación del eje HPA como así también con un mayor riesgo de padecer desórdenes psiquiátricos <sup>35</sup>. Por ejemplo, madres gestantes sobrevivientes de los ataques del 11 de septiembre de 2001 en el “World Trade Center”, tuvieron mayores índices de RCIU al compararlas con madres de la misma población que no se encontraban presentes en el ataque <sup>41</sup>.

El estrés prenatal también afecta el fenotipo metabólico de las crías: Lesage y colaboradores demostraron que el estrés crónico, por restricción del movimiento durante la última semana de gestación, induce hiperfagia y una alteración de la tolerancia a la glucosa en las crías de ratas macho adultas <sup>42</sup>. Por otro lado, existen estudios en los que se observó una predisposición al desarrollo de un fenotipo similar al síndrome metabólico, en ratas a las que se sometió prenatalmente (durante la última semana de gestación) a un paradigma de estrés variable, pero estos animales no mostraron alteraciones del peso al nacer.

Tanto en seres humanos como en animales, es importante el momento de la gestación en la que ocurre el estrés. Las consecuencias del mismo dependen del trimestre (o semana en el caso de los roedores) en el que la madre se ve expuesta a él <sup>40</sup>. El primer tercio de la gestación está caracterizado por un rápido desarrollo de los órganos, por lo que la exposición al estrés durante este periodo produce efectos globales amplios como, por ejemplo, problemas cognitivos, malformaciones cardíacas, sordera y anormalidades intestinales y genitales. En el segundo y tercer tercio los órganos se agrandan y especializan, por lo que la exposición al estrés en este periodo produce alteraciones en el peso al nacer y anormalidades esqueléticas, entre otras <sup>40,43</sup>.

La exposición a estrés prenatal está asociada a un elevado riesgo de desórdenes afectivos en humanos <sup>44,45</sup>. Los modelos animales avalan esta asociación presentando un incremento en la incidencia de comportamientos similares a la ansiedad y a la depresión <sup>46</sup>. Además, ratas estresadas prenatalmente muestran un menor nivel de interacción social <sup>47</sup>. El estrés prenatal también tiene efectos perniciosos a nivel cognitivo y causa desórdenes del desarrollo neurológico. Además, se han observado respuestas asociadas al desarrollo de un fenotipo similar a la esquizofrenia <sup>48</sup>.

El estrés crónico durante la adultez puede tener efectos adversos; sin embargo, la exposición al estrés durante la gestación o la infancia temprana puede tener consecuencias más severas dado que altera el desarrollo del cerebro y, por lo tanto, tiene la capacidad de producir secuelas en la adultez. Por ejemplo, las alteraciones inducidas por el estrés sobre el cerebro en desarrollo, durante la etapa pre y postnatal, pueden resultar en un incremento del riesgo de padecer enfermedades crónicas tanto metabólicas como mentales en la adultez <sup>49</sup>. Se ha propuesto al estrés como un factor de riesgo para el desarrollo del síndrome metabólico (SM) debido a la alteración del eje HPA <sup>50</sup>.

Con el fin de entender los mecanismos subyacentes a la exposición a estrés prenatal, son necesarios estudios con un mejor control de los factores confusores presentes en los estudios epidemiológicos. Para tener un mayor control de los factores ambientales se pueden utilizar modelos animales. Los modelos más difundidos de estrés prenatal consisten, en causar estrés por restricción del movimiento o someter a los animales a un estrés crónico variado. Sin embargo, hay algunos estudios que se han enfocado en el estrés social, usando un paradigma de derrota social.

## TEORÍA DE LA PROGRAMACIÓN FETAL

En 1977, Forsdahl observó que entre 1896-1925 los condados noruegos que tuvieron los índices de mortalidad infantil más altos, también mostraron mayores tasas de mortalidad por enfermedades coronarias, en individuos de 40 a 69 años nacidos en la misma época. Forsdahl postuló, entonces, que la pobreza durante la infancia y la adolescencia, seguida por mucha prosperidad, sería un factor de riesgo para desarrollar aterosclerosis en la adultez <sup>51</sup>.

Barker y Osmond, una década más tarde, encontraron un fenómeno similar en el Reino Unido. Utilizando los datos del peso al nacer en el condado de Hertfordshire, encontraron que un bajo peso al nacer y al año de vida, estaba asociado con un incremento en el riesgo de muerte a causa de enfermedades coronarias y paro cardíaco en la adultez. Barker y colaboradores, concluyeron que los procesos relacionados con el crecimiento y que actúan en la vida perinatal influyen en gran medida en el riesgo de desarrollar enfermedades coronarias en la vida adulta <sup>52,53</sup>.

Barker propuso que la asociación entre el bajo peso al nacer y la enfermedad en la vida adulta refleja los efectos permanentes de la desnutrición fetal <sup>54</sup>.

Finalmente, en 1998, Barker propuso que estos cambios, aunque ocurren en respuesta a un fenómeno transitorio de desnutrición fetal, se convierten en permanentes o programados porque ocurren en periodos críticos de mucha plasticidad <sup>55</sup>. Entonces, muchos tejidos, órganos y el sistema endocrino pueden verse afectados, produciendo no solo el posible desarrollo de enfermedades cardiovasculares y diabetes sino, también, trastornos en la salud mental <sup>56,57</sup>.

Posteriormente, muchos trabajos confirmaron estas observaciones evaluando otras poblaciones <sup>58-62</sup>. Además, se encontraron asociaciones entre el bajo peso al nacer y algunos de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades coronarias, intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2 (DBT2) <sup>63</sup>, hipertensión <sup>64</sup>, insulino-resistencia (IR) <sup>65</sup>, y SM <sup>54</sup>.

Estudios realizados sobre niños nacidos durante o inmediatamente después de la hambruna de Holanda debida a la guerra (1944-1945), presentaron un mayor riesgo a desarrollar psicosis o adicción <sup>44,66</sup>. Lo mismo se observó en un estudio realizado en China, donde los niños que fueron concebidos durante la hambruna de 1959-1961 mostraron un mayor riesgo de desarrollar esquizofrenia <sup>67</sup>.

Whincup y colaboradores (2008), mediante una revisión sistemática de la literatura, reportaron que efectivamente existe una relación inversa entre el peso al nacer y el desarrollo de DBT2, independientemente del peso corporal del individuo y del nivel socioeconómico <sup>68</sup>.

También se observó una relación inversa entre el peso al nacer y la presión sanguínea, en distintas poblaciones pertenecientes a países con ingresos altos, medios o bajos en la infancia o la adultez <sup>68-71</sup>.

El eje HPA, es particularmente susceptible a la programación a largo plazo mediada por GCs. La disfunción del eje HPA, como resultado de la reprogramación fetal, ha sido asociada con el crecimiento cerebral deteriorado, el comportamiento alterado y un incremento en la susceptibilidad a enfermedades crónicas, tales como enfermedades metabólicas y cardiovasculares <sup>72</sup>. Edward y colaboradores, en 1993 propusieron que el bajo peso al nacer está asociado con el desarrollo de hipertensión, pero a diferencia de los estudios anteriores, plantearon que esto se debía a la exposición del feto a un exceso de GCs maternos. Luego de observar que, en ratas, un funcionamiento disminuido de la enzima 11 $\beta$ -HSD2 (que como ya se mencionó

protege al feto de los GCs maternos) estaba asociado con animales que presentaban bajo peso al nacer <sup>36</sup>.

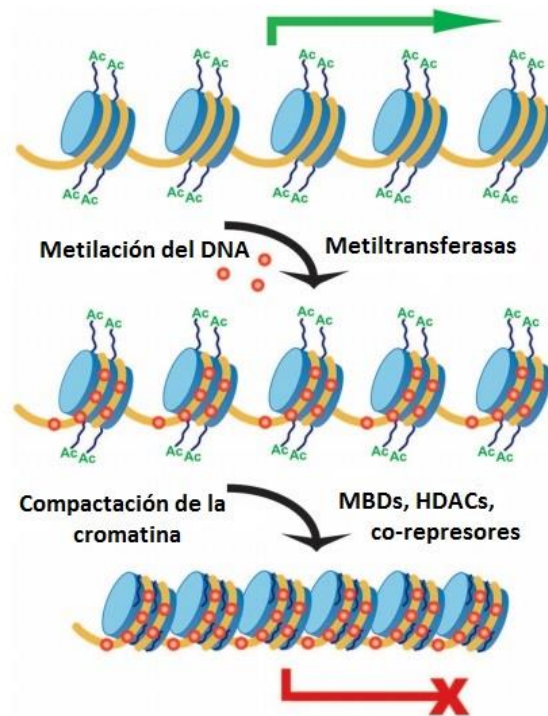
Los efectos del exceso de los GCs y el estrés prenatal durante el embarazo, traen aparejadas diferentes consecuencias psicológicas y fisiológicas dependiendo, no solamente del tiempo de exposición, sino también, del sexo de la cría. Sin embargo, los mecanismos por los cuales la susceptibilidad al estrés prenatal resulta específica de sexo, aún no es clara <sup>35</sup>.

Barker y colaboradores <sup>52</sup> ya habían propuesto que, cuando el ambiente postnatal no coincide con las condiciones del ambiente prenatal estas alteraciones pueden tener consecuencias patológicas. Más tarde, Boersma y Tamashiro <sup>43</sup>, concluyeron que existen diferencias innatas en la vulnerabilidad al estrés, como la capacidad de enfrentarlo, que impactarán en los individuos.

Como ya se ha mencionado, Barker elaboró una teoría de la programación fetal que, más tarde, recibió el nombre de la teoría de los Orígenes del Desarrollo de la Salud y la Enfermedad (DOHaD, por sus siglas en inglés). Esta teoría, plantea que experiencias adversas sufridas durante la vida intrauterina o en las primeras etapas de la vida posnatal pueden tener un rol en la programación de ciertas enfermedades que se desarrollarán durante la vida adulta, particularmente enfermedades cardio-metabólicas.

### *Alteraciones epigenéticas*

El término epigenética, acuñado por Conrad Hal Waddington, es utilizado para referirse a los factores que gobiernan los patrones estables de expresión génica, usualmente transgeneracionales, que ocurren sin cambios en la secuencia del DNA. La regulación epigenética juega un papel importante en el desarrollo de animales y plantas, y es necesaria para lograr la expresión o represión estables de genes de un tipo celular o de un estadio del desarrollo específicos. Hay muchas modificaciones epigenéticas covalentes involucradas en mantener genes activos o reprimidos en forma estable (como se ilustra en la figura 2) <sup>73</sup>. Posiblemente, la modificación epigenética más estudiada sea la metilación del DNA. En el genoma de los mamíferos esta modificación ocurre en citosinas que se encuentran seguidas por una guanina (CpG). En la mayoría de los casos la adquisición y mantenimiento de estas secuencias de CpG metiladas inducen la represión génica <sup>73</sup>.



**Figura 2: Transformación de una región transcripcionalmente activa en cromatina compacta e inactiva.** La metilación del genoma por las metiltransferasas permite el reclutamiento de proteínas con dominios de unión a grupos metilo (MBD) las cuales, luego, reclutan desacetilasas de histonas (HDACs, co-represores transcripcionales y otras enzimas que modifican la cromatina)<sup>74</sup>.

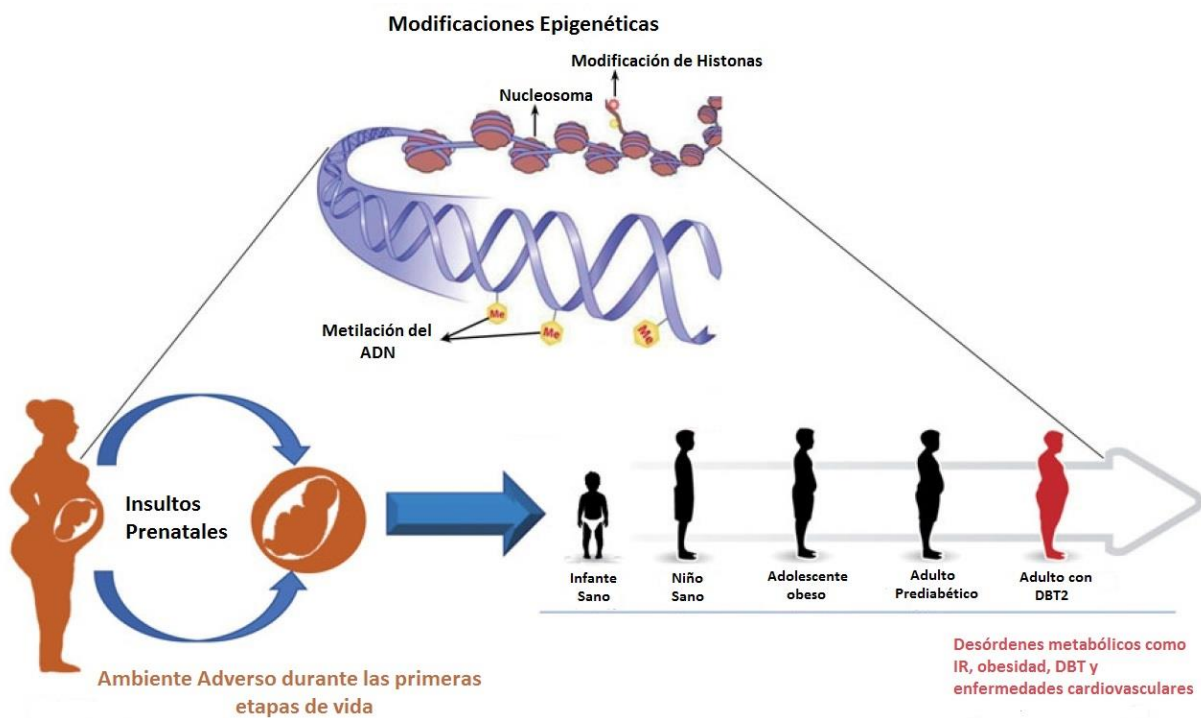
Es importante destacar que las modificaciones epigenéticas en el DNA y la cromatina constituyen el nexo entre el genotipo y el fenotipo. Esto es debido a que no basta con poseer una determinada información en los genes, sino que ésta debe poder manifestarse. Factores ambientales y nutricionales pueden influir sobre el mantenimiento de las modificaciones epigenéticas durante toda la vida <sup>75</sup>.

El modelo de los “dos hits” sugiere que factores genéticos y/o ambientales interrumpen el desarrollo temprano y producen un aumento en la susceptibilidad a enfermedades. El “primer hit”, que ocurre durante el desarrollo temprano, establece el escenario para la vulnerabilidad a un “segundo hit” que ocurre durante la vida adulta y lleva a la patología <sup>76</sup>.

En la bibliografía existen varios trabajos que apoyan este modelo, por ejemplo, Tsai y colaboradores (2019) utilizaron un modelo animal para investigar los efectos del tratamiento prenatal con GCs (“hit 1”) y la alimentación posterior de una dieta grasa (“hit 2”) en el metabolismo. En el trabajo concluyen que ambos tratamientos tuvieron un efecto sinérgico en el peso corporal y el tejido adiposo

visceral <sup>77</sup>. En otros trabajos se observó que el tratamiento prenatal con GCs aumenta la susceptibilidad de las crías, que postnatalmente fueron alimentadas con una dieta grasa, a desarrollar obesidad, insulino-resistencia e hipertensión <sup>78-80</sup>.

Por lo tanto, cambios en las marcas epigenéticas en respuesta a un ambiente prenatal o posnatal adverso, podrían programar al individuo para que durante la vida adulta desarrolle ciertas enfermedades metabólicas (figura 3).

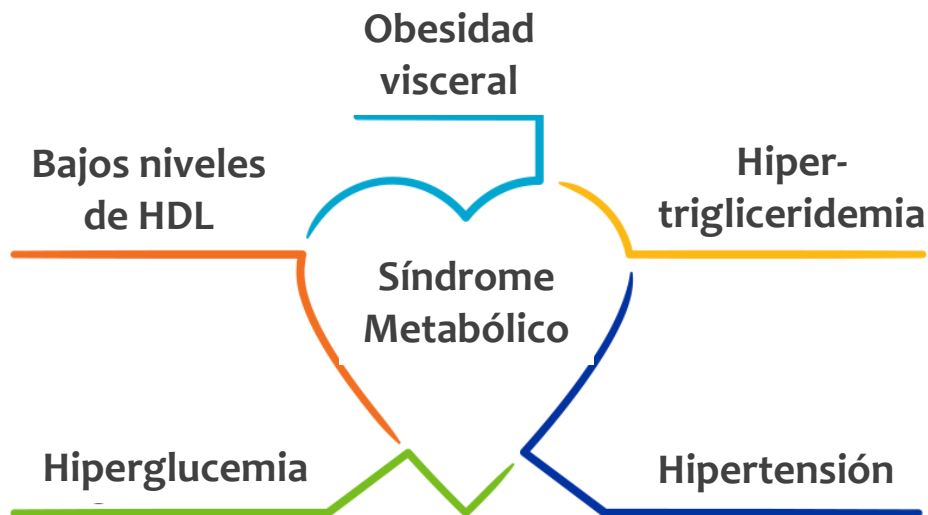


**Figura 3: Mecanismos epigenéticos en el contexto de la teoría DOHaD.** Durante la gestación o en los primeros periodos de vida de un individuo, la exposición a un ambiente adverso puede ocasionar el cambio de marcas epigenéticas como la modificación de histonas, la metilación del DNA, y el cambio en la regulación de RNAs no codificantes. La persistencia de estos cambios en la vida adulta, pueden condicionar a que el individuo desarrolle desórdenes metabólicos como insulino-resistencia, obesidad, DBT2 y enfermedades cardiovasculares. Modificado de <sup>81</sup>.

## SINDROME METABOLICO (SM)

En el año 1988, Reaven describió un grupo de anomalías metabólicas (hipertensión, hipertrigliceridemia, bajos niveles de colesterol HDL e hiperglucemia) asociadas a un incremento del riesgo cardiovascular, que denominó "síndrome X" <sup>82</sup>. Posteriormente denominado "síndrome de insulino-

resistencia” incluyó además a la obesidad, fundamentalmente central o abdominal. Actualmente, este conjunto de desórdenes metabólicos es llamado Síndrome Metabólico o Cardiometabólico, y se lo define, según el “National Health and Nutrition Survey III” <sup>83</sup>, como la combinación de 3 o más de los 5 desórdenes, mostrados en la figura 4.



**Figura 4: Desórdenes del Síndrome Metabólico.** Modificado de <sup>84</sup>.

El síndrome metabólico se encuentra estrechamente relacionado con la alta prevalencia de obesidad, especialmente en los países desarrollados. En Estados Unidos de Norteamérica este síndrome afecta a un 33% de la población adulta <sup>85</sup>, en los países europeos afecta entre el 22 – 36% de la población de entre 40 y 55 años <sup>86</sup>. Su relación con la obesidad es tan notoria que algunas organizaciones consideran que la definición del síndrome está dada por la presencia de obesidad más dos de alguno de los demás factores mencionados (ver tabla 1).



	Organización Mundial de la Salud	Programa Nacional de Educación del Colesterol	Federación Internacional de la Diabetes
<b>Criterios requeridos</b>	Hiperglucemia/ insulino resistencia más 2 o más de otros 4 criterios	3 o más de cinco criterios	Obesidad Central más 2 o más de otros 4 criterios
<b>Obesidad Central</b>	Relación cintura/cadera > 0,9 (♂), >0,85 (♀) y/o IMC > 30Kg/m <sup>2</sup>	Circunferencia de la cintura: Caucásicos: ≥ 102 cm (♂), ≥ 88 cm (♀) Asiáticos: ≥ 90 cm (♂), ≥ 80 cm (♀) Se considera como punto de corte ≥94 cm (♂), ≥ 80 cm (♀) para algunos adultos no asiáticos con fuerte predisposición genética a la insulino resistencia	Circunferencia de la cintura: Europeos, Africanos Sub-Sahara, mediterráneos del este y del este medio (Arabes): ≥ 94 cm (♂), ≥ 80 cm (♀) Sudasiáticos, Chinos y Sud y centro americanos: ≥ 90 cm (♂), ≥ 80 cm (♀) Japoneses: ≥ 85 cm (♂), ≥ 90 cm (♀)
<b>Hiperglucemia</b>	Insulino resistencia: diabetes, glucemia alterada en ayunas Intolerancia a la glucosa o uptake de glucosa por debajo del percentilo 25 medido por clamp hiperinsulinémico euglucémico	Niveles de glucosa plasmática en ayunas ≥5,6mmol/L o estar medicado por hiperglucemia	Niveles de glucosa plasmática en ayunas ≥5,6mmol/L o diagnóstico previo de diabetes tipo 2
<b>Dislipidemia</b>	Niveles de triglicéridos ≥1,7 mmol/L y/o Colesterol HDL <0,9 mmol/L (♂), <1,0 mmol/L (♀)	Niveles de triglicéridos ≥1,7 mmol/L o estar recibiendo tratamiento para la hipertrigliceridemia Niveles de Colesterol HDL <1,0 mmol/L (♂), <1,3 mmol/L (♀) o recibir tratamiento para el HDL bajo	Niveles de triglicéridos ≥1,7 mmol/L o estar recibiendo tratamiento para la hipertrigliceridemia Niveles de Colesterol HDL <1,0 mmol/L (♂), <1,3 mmol/L (♀) o recibir tratamiento para el HDL bajo
<b>Presión arterial elevada</b>	Presión arterial ≥ 140/90 mmHg	Presión arterial sistólica ≥ 130 mmHg Presión arterial diastólica ≥ 85 mmHg o estar en tratamiento por hipertensión	Presión arterial sistólica ≥ 130 mmHg Presión arterial diastólica ≥ 85 mmHg o estar en tratamiento por hipertensión
<b>Otros</b>	Microalbuminuria: Excreción urinaria de albúmina > 20 mg/min o relación albúmina/creatinina > 3,5 mg/mmol		

Tabla 1: Criterios para diagnosticar el síndrome metabólico.

En Latinoamérica, alrededor de un 20-34% de la población adulta padece síndrome metabólico; la prevalencia aumenta con la edad y se estima que 1 de cada 3 o 4 personas mayores de 20 años cumple con criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico <sup>87</sup>. En nuestro país su prevalencia se encuentra entre un 20 y 27,5% <sup>88</sup>.

Algunos componentes del SM, que se detallan a continuación, son de particular importancia para esta tesis:

### *Obesidad*

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el sobrepeso como un Índice de Masa Corporal (IMC = peso/altura al cuadrado) ≥25 Kg/m<sup>2</sup>, y la obesidad como un IMC ≥ 30 kg/m<sup>2</sup>, aunque hay pruebas de que el riesgo de padecer enfermedades crónicas (diabetes, hipertensión, etc.) aumenta progresivamente a partir de un IMC de 21 kg/m<sup>2</sup> <sup>89</sup>.

Las últimas estadísticas de la OMS indican que en 2016 había en todo el mundo, aproximadamente, más 1900 millones de adultos (mayores de 18 años) con sobrepeso y al menos 650 millones de adultos obesos <sup>90</sup>.

De acuerdo con estadísticas recientes, en Latinoamérica y el Caribe cerca del 58% de los habitantes de la región vive con sobrepeso. La obesidad afecta a 140 millones de personas, el 23% de la población regional y las mayores prevalencias pueden observarse en países del Caribe <sup>91</sup>. Esto se debe a que, entre otras razones, en la mayoría de los países latinoamericanos, en los últimos años la población ha experimentado un cambio en la dieta, que implica el descenso en el consumo de frutas y verduras y un incremento del consumo de comida rica en grasas saturadas, azúcares y sal, en paralelo a la disminución en los niveles de actividad física. En nuestro país, entre un 30 y un 56% de la población no alcanza los niveles mínimos recomendados de actividad física <sup>89</sup>. Además, se calcula que hay un 37,1% de la población que presenta sobrepeso y un 20,8% obesidad <sup>89</sup>.

La creciente prevalencia mundial de la obesidad ha llevado a que ésta sea reconocida como uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de la hipertensión <sup>92</sup>. De acuerdo con lo publicado en estudios poblacionales, al menos dos tercios de los hipertensos son obesos <sup>93</sup>. La obesidad puede llevar a la hipertensión y a la enfermedad cardiovascular mediante la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) y mediante el incremento de la actividad simpática <sup>94,95</sup>.

## ***Dislipemias***

### *Hipertrigliceridemia*

Los triglicéridos al igual que el colesterol, son transportados a las células del organismo por las lipoproteínas de la sangre. Los niveles elevados de triglicéridos aumentan el riesgo cardiovascular de desarrollar aterosclerosis <sup>96</sup>. El valor normal de los triglicéridos en suero es < 150 mg/dL (1.7 mmol/L) indistintamente del sexo; cuando los valores son mayores a esta cifra se considera que la persona tiene niveles elevados (200 a 499 mg/dL) o muy elevados ( $\geq$  500 mg/dL) <sup>97</sup>.

### *Bajos niveles de colesterol HDL*

Las partículas de HDL transportan el colesterol de las células hacia el hígado, donde puede ser eliminado del organismo. El colesterol HDL es considerado "benigno" ya que los niveles elevados reducen el riesgo cardiovascular. Las personas con niveles bajos de HDL tienen un mayor riesgo cardiovascular <sup>96</sup>. A menudo esto es una consecuencia de la inactividad física, la obesidad o el hábito de fumar. También es común entre las personas que padecen de DBT2.

Los valores para considerar si el HDL se encuentra bajo son: hombre  $\leq 40$  mg/dL (1.0 mmol/L); mujer  $\leq 50$  mg/dL (1.3 mmol/L) <sup>98</sup>.

### ***Hiper glucemia y resistencia a la insulina (insulino-resistencia IR)***

Consiste en la presencia de niveles elevados de glucosa en sangre debido a que el organismo se torna resistente a la insulina, por lo que la hormona no ejerce su efecto hipoglucemiante. La hiper glucemia forma parte de los criterios diagnósticos de la DBT2. Este tipo de diabetes se presenta generalmente en la edad adulta. Los individuos que presentan niveles de glucosa plasmática en ayunas  $\geq 100$  mg/dL (5.5 mmol/L) se consideran hiperglucémicos y  $\geq 110$  mg/dL diabéticos (5.6 mmol/L).

La insulino-resistencia es un término que describe la incapacidad de la insulina para mantener la homeostasis de la glucosa <sup>99</sup>. Se presenta cuando existe una falla en los tejidos blanco de insulina (tejido adiposo, hígado y músculo esquelético) y, en consecuencia, no disminuye la concentración de glucosa en sangre. La resistencia a los efectos de la insulina representa un proceso clave en el desarrollo de la DBT2. Al principio, en el estado prediabético, las células  $\beta$  pancreáticas aumentan la secreción de insulina para compensar la resistencia a la misma y mantener la homeostasis normal de glucosa (hiperinsulinemia compensatoria). Sin embargo, tras el agotamiento de las células  $\beta$  pancreáticas, este mecanismo adaptativo falla y la homeostasis de la glucosa se ve afectada, manifestándose la DBT2 <sup>100</sup>. La DBT2 es precedida por un estado de tolerancia anormal a la glucosa o intolerancia a la glucosa y, ocurre cuando los niveles de glucosa en sangre son más altos de lo normal pero no son tan elevados como para ser clasificados como diabetes (DBT). En el estadio de intolerancia a la glucosa existe una disminución significativa de la masa y función de las células  $\beta$  que progresa hasta alcanzar su manifestación clínica completa <sup>101</sup>. Por tal motivo, las personas que sufren intolerancia a la glucosa tienen un elevado riesgo de desarrollar DBT2, al igual que un alto riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares e infecciones <sup>102</sup>.

### **TEJIDO ADIPOSO**

El tejido adiposo blanco visceral (TABv), es un órgano de almacenamiento de lípidos. Este tejido aumenta tanto en número de células como en tamaño de estas en la obesidad. Compuesto por adipocitos y estroma vascular, también

funciona como un órgano endócrino; y secreta: leptina, adiponectina, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-6, MIF, IL-10. La expansión del TABv y la infiltración inmune celular, son eventos cruciales que llevan a la insulino-resistencia. El TABv participa en la captación de la glucosa estimulada por insulina y en la liberación de los ácidos grasos libres (FFAs), siguiendo a la lipólisis <sup>103</sup>, coordinando a través de distintas citoquinas y adipoquinas el balance energético, la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina <sup>104</sup>.

### *Inflamación*

La obesidad está asociada a un estado de inflamación crónica. Hotamisligil y colaboradores <sup>105</sup> demostraron que la citoquina pro-inflamatoria, factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , se encontraba expresada en el tejido adiposo de ratones obesos y esto, además, estaba asociado con la presencia de insulino-resistencia. El metabolismo lipídico disfuncional que acompaña a la obesidad puede perjudicar la cascada de señalización de la insulina; los ácidos grasos libres (FFAs) circulantes tienen un efecto negativo en los tejidos blanco de insulina, a través de la activación de distintas vías inflamatorias. Además, la acumulación de derivados lipídicos como el diacilglicerol (DAG) y las ceramidas pueden regular negativamente las acciones de la insulina <sup>103</sup>.

La obesidad y la inflamación crónica asociada a la misma, son las responsables de generar un estado de insulino-resistencia. La secreción de quimioattractantes por parte de los adipocitos, tales como MCP-1 y MIF y citoquinas IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  producen la infiltración de diversas células del sistema inmune hacia el tejido adiposo. Un metabolismo lipídico disfuncional en el tejido adiposo, lleva a un aumento en circulación de FFAs, iniciando respuestas inflamatorias en la población de células infiltrantes. Esto ocasiona un bucle de retroalimentación positiva y se secretan más citoquinas proinflamatorias que exacerban este estado patológico. La disrupción del normal funcionamiento del tejido adiposo ocasiona defectos en la homeostasis de la glucosa hepática y en el músculo esquelético, resultando en una insulino-resistencia sistémica y, finalmente, llevando al desarrollo de DBT2 <sup>103</sup>.

En la obesidad, el perfil de macrófagos presentes en el tejido adiposo favorece el fenotipo de macrófago M1 frente al M2. Los macrófagos M1 secretan citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, mientras que los macrófagos M2 secretan citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y el antagonista del receptor de IL-1. El grado de macrófagos infiltrantes está asociado con la progresión de

la insulino-resistencia, ya que la infiltración de macrófagos M1 disminuye la sensibilidad a la insulina como resultado de la secreción aumentada de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, que generan un ambiente resistente a la hormona <sup>106</sup>.

TNF- $\alpha$ , es una potente citoquina proinflamatoria secretada por monocitos y macrófagos, que a través de la activación de distintas vías de señalización promueve la secreción de otras citoquinas inflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-6 <sup>103</sup>. Fue el primer mediador inflamatorio en ser relacionado con la insulino-resistencia inducida por obesidad <sup>105</sup>. TNF- $\alpha$  interfiere en la señalización del receptor de insulina en los adipocitos y promueve la resistencia a insulina inhibiendo la transcripción del sustrato del receptor de insulina (IRS-1) <sup>107</sup> e induciendo la fosforilación en los residuos serina de este sustrato (lo que suprime la señalización) <sup>108</sup>.

### *Adipoquinas*

Dentro de las adipoquinas más extensamente estudiadas nos encontramos con la leptina, la adiponectina y la resistina.

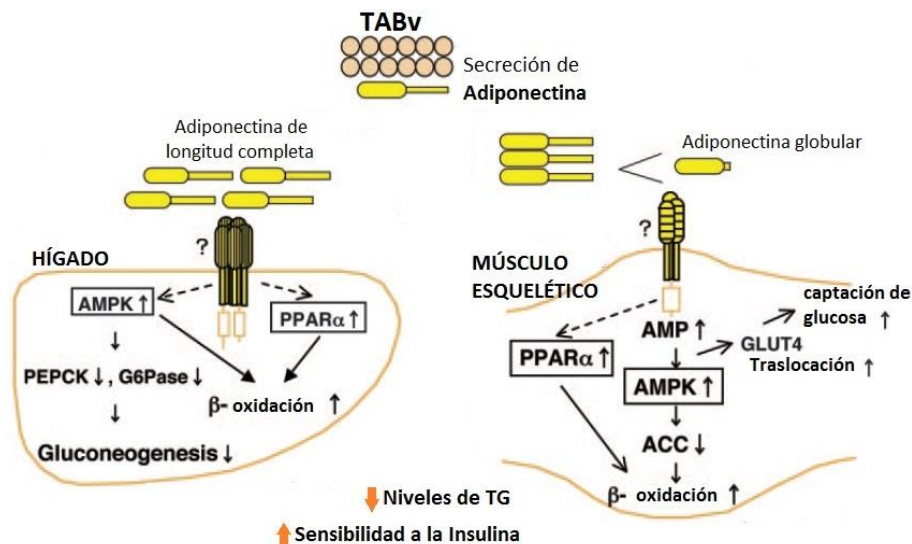
### *Leptina*

La leptina es una hormona producida por los adipocitos y, en condiciones fisiológicas, sus niveles en circulación correlacionan positivamente con la masa del TAB. Su función principal es actuar en el hipotálamo donde regula la ingesta de alimentos y estimula el gasto energético. Tiene acciones anorexígenas, es decir, que suprime el apetito. Además, regula el metabolismo basal, la función reproductiva, la masa ósea y la secreción de insulina. Su síntesis se encuentra regulada por la ingesta de alimentos y por otras hormonas relacionadas a la ingesta, pero también depende del estado energético del individuo, de las hormonas sexuales (su síntesis puede ser suprimida por la testosterona y aumentada por los estrógenos y la progesterona), y por un amplio rango de mediadores inflamatorios (dependiendo el contexto aumentan o suprimen su síntesis) <sup>109</sup>.

La mayoría de los pacientes obesos y los modelos animales de obesidad inducida por la dieta presentan elevados niveles en circulación de leptina, indicativos de una leptino-resistencia <sup>99</sup>.

### Adiponectina

La adiponectina es una hormona sintetizada y secretada exclusivamente por el tejido adiposo. Su principal función es la de modular el metabolismo lipídico y de la glucosa, promoviendo la oxidación de ácidos grasos y la utilización de glucosa, reprimiendo la gluconeogénesis hepática. Se ha reportado que la obesidad causa una reducción en la expresión de adiponectina <sup>110</sup>. En ratones, bajos niveles de adiponectina conducen a la alteración de la tolerancia a la glucosa y a una elevada producción de glucosa por parte del hígado <sup>111</sup>. En humanos, se ha observado que individuos obesos presentan niveles de adiponectina disminuidos y esto eleva el riesgo de padecer insulino-resistencia y enfermedades cardiovasculares <sup>112</sup>. En tejidos metabólicamente activos, la adiponectina aumenta la sensibilidad a la insulina promoviendo la utilización de glucosa y la oxidación de ácidos grasos <sup>112</sup> (figura 5).



**Figura 5: Adiponectina puede activar a AMPK y PPAR $\alpha$  en el hígado y en el músculo esquelético.** En el músculo esquelético ambas formas de adiponectina (globular o de longitud completa) activan AMPK, estimulando de esta manera la fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y promoviendo la oxidación de ácidos grasos y la recaptación de glucosa. Adiponectina también activa PPAR $\alpha$ , que estimula la oxidación de ácidos grasos y disminuye el contenido de triglicéridos en el músculo. En el hígado, solo la forma de longitud completa activa AMPK y, de este modo, se reducen moléculas involucradas en la gluconeogénesis y aumenta la fosforilación de ACC y la oxidación de ácidos grasos. En este órgano también activa a PPAR $\alpha$  produciendo los mismos efectos que en el músculo. Todas estas alteraciones aumentan la sensibilidad a la insulina *in vivo*. TABv: tejido adiposo blanco visceral; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; G6Pase: glucosa 6-fosfatasa. <sup>112</sup>.

*Resistina*

La resistina es una hormona proteica secretada principalmente por el TABv en roedores <sup>113</sup>. Los niveles en suero de la misma aumentan marcadamente en modelos animales de obesidad inducida genéticamente o por la dieta <sup>114</sup>.

Resistina es producida durante la diferenciación de los adipocitos y antagoniza los efectos de insulina, disminuyendo la captación de glucosa por parte de estas células, por el músculo esquelético y otros tejidos. En ratas y ratones, la expresión de resistina es regulada positivamente por GCs, hormonas de crecimiento, prolactina, testosterona y suprimida por insulina, adrenalina y somatostatina <sup>115</sup>.

Los niveles en suero de esta hormona se encuentran elevados en modelos animales de obesidad y diabetes, indicando una desregulación de resistina en estas enfermedades crónicas <sup>116</sup>. Estudios realizados en sujetos obesos pero no diabéticos, también encontraron altos niveles en suero de esta hormona y, a su vez, una correlación directa entre los niveles de resistina y la adiposidad, medida por el IMC <sup>117,118</sup>.

En el año 2003 Moon y colaboradores, demostraron que la administración de resistina recombinante a ratones genéticamente obesos o inducidos por la dieta, llevaba a una intolerancia a la glucosa. El bloqueo de la resistina mejoró la glucemia y la tolerancia a la glucosa en ratones obesos y sanos. También se ha observado que la resistina disminuye la captación de glucosa en el músculo esquelético, independientemente de la señalización mediada por insulina <sup>119</sup>.

***Proteínas “forkhead box O” (FOXO)***

La familia de proteínas “Forkhead box O” (FOXO), en mamíferos, consiste en 4 miembros distintos: FOXO1, FOXO3, FOXO4 y FOXO6. Estas cuatro isoformas comparten un motivo estructural en común, denominado “Forkhead box” o dominio de “hélice alada” que es el responsable de unirse al DNA en el núcleo celular <sup>120</sup>. FOXO1 es considerado el mayor regulador de la cascada de señalización de insulina y la homeostasis de glucosa <sup>121</sup>. En el tejido adiposo, FOXO1 inhibe la diferenciación de los adipocitos de diversas formas: induciendo la expresión del inhibidor del ciclo celular p21 e inhibiendo la expresión de PPAR $\gamma$ , uno de los principales genes que promueven la adipogénesis <sup>122</sup>. La sobreexpresión de FOXO1 en adipocitos diferenciados resultó en una mejora en la tolerancia a la glucosa y a la sensibilidad de la insulina, en adipocitos más pequeños y en una expresión aumentada de

adiponectina, sugiriendo que la expresión constitutiva de FOXO1 podría resultar en una función mejorada a largo plazo del tejido adiposo <sup>123</sup>.

### ***Receptor del proliferador activado de peroxisoma (PPAR)***

Los PPAR son factores de transcripción dependientes de ligando que regulan la expresión de diferentes genes involucrados en la adipogénesis, el metabolismo lipídico y la inflamación <sup>124</sup>.

PPAR $\gamma$  se expresa mayormente en el TAB y en el tejido adiposo marrón (TAM), donde regula la adipogénesis, el metabolismo lipídico y la sensibilidad a la insulina, y se encuentra en menor proporción en otros tejidos metabólicos como el hígado y el músculo esquelético. La activación de PPAR $\gamma$  lleva a un aumento en la acción de la insulina en sus tejidos blanco, mediante la reducción de la glucosa hepática y mejorando la eliminación de glucosa periférica <sup>125</sup>. Por lo tanto, antagoniza la inflamación, suprimiendo la acción de NF- $\kappa$ B, promoviendo la señalización de insulina <sup>126</sup>. Por eso sirve como un importante blanco terapéutico para el tratamiento de DBT2, como así también el SM.

### ***Las sirtuinas (SIRT)***

Las sirtuinas son una familia de desacetilasas de histonas y otras proteínas que requieren NAD<sup>+</sup> como cofactor enzimático para su actividad. Los niveles de NAD<sup>+</sup> aumentan en situaciones de estrés energético, situación que ocurre por ejemplo durante el ayuno, la restricción calórica y el ejercicio. Entonces, las oscilaciones de NAD<sup>+</sup> le confieren a las sirtuinas la habilidad de detectar cambios en el metabolismo y la homeostasis energética y, en consecuencia, coordinar respuestas celulares para mantener la integridad del genoma, entre otras funciones. De este modo, las sirtuinas resultan clave en la interacción entre el ambiente y el genoma, como así también en respuestas al estrés a nivel celular y del organismo <sup>127</sup>. SIRT1 promueve la expresión y secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas y estimula la movilización lipídica en el tejido adiposo blanco, a través de la desacetilación de PPAR $\gamma$ . Durante la restricción calórica, el aumento de SIRT1 mejora la respuesta a la insulina, disminuye la absorción de colesterol y reduce el almacenamiento lipídico <sup>128</sup>. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual actúa aún no está del todo claro <sup>129</sup>.

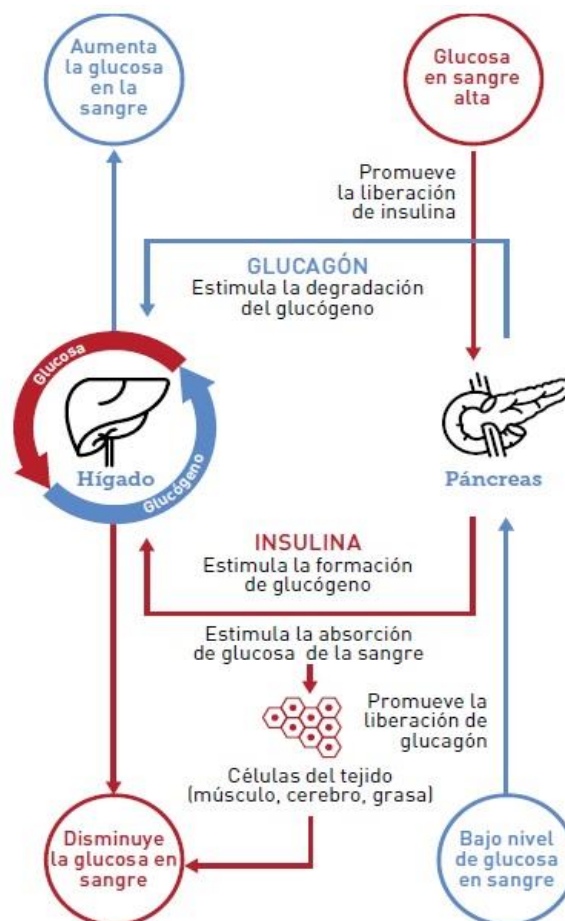
Se ha observado que la hiperacetilación proteica está asociada con la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina, sugiriendo que las enzimas que regulan la acetilación o desacetilación, juegan un papel importante en estos procesos patológicos <sup>130</sup>.



## HÍGADO

El hígado tiene un papel central en la regulación sistémica de la glucosa y los lípidos durante la ingesta y el ayuno y, además, también depende de estos sustratos para sus necesidades energéticas <sup>131</sup>. El hígado controla la homeostasis de la glucosa interviniendo en varias vías del metabolismo de este hidrato de carbono, tales como la glucogenogénesis, glucogenolisis, glucólisis y gluconeogénesis <sup>132</sup>.

Durante el ayuno, la combinación de los niveles altos de glucagón y bajos de insulina aumenta la producción hepática de glucosa para satisfacer las demandas metabólicas de los tejidos periféricos. Este incremento de la glucosa hepática, inicialmente se origina con la ruptura del glucógeno almacenado en el hígado (glucogenolisis). Este proceso es opuesto a lo que ocurre durante la ingesta, donde los niveles de la hormona glucagón disminuyen y aumenta la concentración de insulina, cuya señal estimula el aumento de la captación de glucosa hepática, la síntesis de glucógeno, suprime la producción de glucosa hepática e induce la síntesis de ácidos grasos para el almacenamiento y subsecuente utilización <sup>133</sup> (figura 6).



**Figura 6: Par coordinado Insulina- Glucagon.** El páncreas es quien se encarga de secretar las hormonas glucagón e insulina según la concentración de glucosa en sangre. Si hay bajos niveles de glucosa en sangre se secreta glucagón que en el hígado va a promover la degradación de glucógeno contribuyendo, de este modo, a un aumento en la glucemia. Contrariamente, cuando los niveles de glucosa en sangre son altos el páncreas secreta insulina para que actúe promoviendo la captación de glucosa y, de esta manera, la glucemia disminuye. Figura modificada de <sup>102</sup>.

Durante la insulino-resistencia, la insulina falla en estimular en el hígado el transporte de glucosa hacia dentro de los hepatocitos y suprimir, de manera adecuada, la producción de glucosa hepática frente al ayuno y luego de la ingesta. La imposibilidad de la insulina de inhibir la producción de glucosa hepática, resulta de la falla inicial para inhibir la glucogenólisis seguida de una incapacidad, por parte de la insulina, de suprimir apropiadamente la gluconeogénesis. Sin embargo, a pesar de la incapacidad de la insulina de regular la homeostasis de glucosa, los individuos insulino-resistentes muestran lipogénesis *de novo* y re-esterificación, provocando el almacenamiento de lípidos en el hígado. Además, individuos insulino-resistentes tienen una secreción aumentada y un “clearance” disminuido de triglicéridos ocasionando una concentración aumentada de triglicéridos en sangre. Por lo tanto, durante el avance de la insulino-resistencia, los efectos que promueve la insulina, en cuanto a los lípidos, se mantienen, pero el control de la síntesis de la glucosa hepática es incorrecto/defectuoso, lo que lleva a una hiperglucemia e hipertrigliceridemia <sup>133</sup>.

### ***Inflamación***

En el hígado podemos encontrar células del sistema inmune, tales como los macrófagos, que reciben el nombre de células de Kupffer. Similarmente a lo que se observa en el tejido adiposo, durante la inflamación producida por obesidad, el perfil de macrófagos en el hígado favorece más al proinflamatorio que al antiinflamatorio. El perfil de macrófago antiinflamatorio mantiene la sensibilidad a la insulina, a través de la secreción de citoquinas antiinflamatorias como IL-4, mientras que el perfil de macrófago proinflamatorio promueve la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática no alcohólica (hígado graso) <sup>134</sup>.

***Coactivador 1  $\alpha$  del receptor del proliferador activado de peroxisoma (PGC1 $\alpha$ )***

El coactivador 1  $\alpha$  del receptor del proliferador de peroxisoma activado (PGC1 $\alpha$ ) es un miembro de la familia de coactivadores de la transcripción y juega un papel central en la regulación del metabolismo energético celular. Dependiendo del promotor A o B, a partir del que se inicia la transcripción de este gen, se pueden definir dos isoformas PGC1 $\alpha$  promotor A (o PGC1 $\alpha$  isoforma A) y PGC1 $\alpha$  promotor B (PGC1 $\alpha$  isoforma B) <sup>135</sup>. Ambas estimulan la biogénesis mitocondrial, promueven la remodelación del tejido muscular a un tipo de fibra que es metabólicamente más oxidativa y menos glucolítica y, participan en la regulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos. El ayuno produce un aumento en la expresión de este coactivador, que a su vez estimula la gluconeogénesis hepática y el metabolismo oxidativo de los ácidos grasos <sup>136</sup>. PGC1 $\alpha$  coactiva una variedad de factores de transcripción, tales como el GR, el factor hepático nuclear 4 $\alpha$  y FOXO1. Estos factores de la transcripción son clave para la regulación de la gluconeogénesis hepática.

En modelos animales insulino-deficientes, se observó que los niveles de expresión de PGC1 $\alpha$  estaban aumentados en el hígado <sup>137</sup>. En otro estudio se encontró que los niveles de PGC1 $\alpha$  determinan la relación de IRS1:IRS2 en los hepatocitos, impactando directamente en la señalización del receptor de insulina vía AKT <sup>138</sup>. Estudios realizados en ratones, mostraron que un aumento en la expresión de PGC1 $\alpha$  puede ser benéfica o deletérea, dependiendo del tejido: mientras que en el tejido adiposo y el músculo esquelético resulta beneficiosa, en el hígado su papel es claramente deletérea ya que induce la producción de glucosa hepática e inhibe la secreción de insulina <sup>139</sup>.

***PPAR $\alpha$*** 

PPAR $\alpha$  se expresa mayoritariamente en hepatocitos, cardiomiocitos, enterocitos y en las células del túbulo proximal del riñón. Está altamente expresado en aquellos tejidos que están involucrados en la oxidación de ácidos grasos. La activación de PPAR $\alpha$  lleva a una disminución en los niveles lipídicos y a la eliminación de triglicéridos plasmáticos, resultando en altos niveles de HDL. En el hígado, PPAR $\alpha$  controla el metabolismo lipídico, como la recaptación, la activación y la oxidación de los ácidos grasos, la lipólisis, la cetogénesis y el almacenamiento de triglicéridos <sup>140</sup>.

### *Supresores de la señal de citoquinas (SOCS)*

Los supresores de la señal de citoquinas (SOCS) son una familia de proteínas que juegan un papel esencial mediando las respuestas antiinflamatorias en células inmunes y en órganos tales como el hígado, el tejido adiposo y el músculo esquelético. En la obesidad, la expresión de las proteínas SOCS se encuentra elevada en varios tejidos que son vitales para la regulación del metabolismo y la sensibilidad a la insulina. Por ejemplo, la expresión de SOCS1 y SOCS3 está aumentada en el hígado, en el tejido adiposo y en el músculo de ratones obesos <sup>141</sup>. Esto ocurre porque varias citoquinas inducen su expresión y, como ya se ha mencionado, la obesidad trae aparejada inflamación e insulino-resistencia. Uno de los mecanismos por los cuales la inflamación causa insulino-resistencia involucra a las proteínas SOCS. Se han propuesto tres mecanismos mediante los cuales las proteínas SOCS pueden inhibir la acción de la insulina. El primero plantea la inhibición catalítica del receptor de insulina, el segundo la competencia con las proteínas IRS para la unión a fosfotirosinas del receptor de insulina activado y, por último, la marcación de proteínas IRS para degradación proteasómica. Cuando a los ratones insulino resistentes, se los trata con una sonda antisentido contra SOCS3 se observa que mejora la sensibilidad a la insulina y la esteatosis hepática in vivo <sup>142</sup>.

### *SIRT 1 y 3*

SIRT1 desacetila numerosos blancos involucrados en el metabolismo y la homeostasis energética, entre ellos, PGC1 $\alpha$  que activa genes relacionados a la gluconeogénesis y aumenta la salida de la glucosa hepática durante la restricción calórica. Además, SIRT1 produce un aumento en el transporte reverso de colesterol lo que mejora el estado de insulino-resistencia <sup>128</sup>.

SIRT3 es la principal enzima desacetilasa mitocondrial, está involucrada en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, en el metabolismo de aminoácidos, en la cadena de transporte de electrones, entre otros procesos. Los niveles de expresión de esta sirtuina varían dependiendo de la dieta <sup>143</sup>. Numerosos estudios han reportado que la restricción calórica aumenta la expresión de SIRT3 <sup>144,145</sup>. Contrariamente, cuando los ratones son alimentados con una dieta alta en energía se suprime SIRT3 y hay una elevada acetilación proteica en las mitocondrias hepáticas <sup>146</sup>. El mismo efecto se observa en las mitocondrias hepáticas de ratones transgénicos que no expresan SIRT3 <sup>147</sup>.

## MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo esquelético es uno de los principales reguladores del metabolismo de carbohidratos y lípidos, participa de las funciones termogénicas y en varios procesos metabólicos. El músculo esquelético es muy susceptible a cambios en la disponibilidad de glucosa y ácidos grasos. A partir de estos sustratos, mediante distintas vías enzimáticas, se encarga de obtener energía a través de la glucólisis y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos <sup>148</sup>.

Cuando la síntesis de glucógeno en el músculo esquelético es defectuosa se la asocia con la insulino-resistencia. La desregulación del metabolismo de los ácidos grasos en el músculo, también está asociada con una vía de señalización de insulina defectuosa <sup>103</sup>.

En la obesidad existe un incremento en los niveles de ácidos grasos, lo que ocasiona la acumulación de intermediarios lipídicos tóxicos, estrés oxidativo y autofagia en las fibras del músculo. La lipotoxicidad es una de las causas más comunes de la insulino-resistencia en el músculo esquelético <sup>148</sup>. La mayoría de los trabajos, en la literatura disponible, sugieren que la insulino-resistencia en el músculo esquelético se debe a una mala señalización de insulina.

### *Transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4)*

El transportador de glucosa 4 (GLUT4) es parte de una familia de proteínas transportadoras de glucosa con 12 dominios transmembrana. GLUT4 es responsable de mediar la recaptación de glucosa estimulada por insulina, en el tejido adiposo, el músculo esquelético y el corazón. Luego de la estimulación vía insulina, GLUT4 se transloca desde el citoplasma hacia la membrana plasmática para mediar la recaptación de la glucosa desde la circulación hacia el interior celular <sup>149</sup>. La actividad de GLUT4 está regulada a dos niveles primero por la translocación a la membrana plasmática y en segundo lugar a nivel génico. En ausencia de insulina o ejercicio, el 90% de GLUT4 permanece intracelular, mientras que en presencia de estos factores las vesículas que almacenan GLUT4 realizan la exocitosis del mismo uniéndose a la membrana plasmática. Este aumento en el número de moléculas de GLUT4 disponibles en la superficie celular, lleva a un aumento de la velocidad máxima del transporte de glucosa hacia el interior de las células. Cuando disminuyen los niveles de insulina circulantes, GLUT4 se recicla <sup>150</sup>.

Estudios en ratones demostraron que la pérdida de la expresión de GLUT4 lleva a una disminución en la sensibilidad a la insulina, mientras que la

sobreexpresión del transportador en ratones insulino-resistentes, restaura la sensibilidad a la insulina <sup>151</sup>.

## VARIACIONES EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS Y A LA DIETA

Se ha observado una amplia variación entre los individuos dentro de un mismo estudio, lo que sugiere la existencia de individuos resistentes y vulnerables entre los sometidos a estrés prenatal. Estas diferencias individuales se vuelven aparentes en modelos de roedores criados en forma selectiva para un determinado rasgo. Por ejemplo: las cepas de ratas Lewis y Fisher 344 son animales que poseen un nivel de actividad del eje HPA aumentado (Fisher 344) o atenuado (Lewis) y demuestran diferir en diversos rasgos relacionados al eje HPA tanto a nivel conductual como fisiológico <sup>152</sup>. Stohr y colaboradores demostraron que el estrés prenatal presenta distintos efectos sobre estas dos cepas <sup>153</sup>. Resultados similares se observaron en otras cepas de ratas con distintos niveles de ansiedad <sup>154</sup>. Estos y otros estudios sugieren que el estrés prenatal puede tener efectos opuestos dependiendo de la genética de cada individuo.

Además, el estrés prenatal puede afectar de manera distinta a los machos y hembras dependiendo del momento de la gestación en el que se ejerce, ya que durante el desarrollo intrauterino el desarrollo neuronal y cerebral es diferente para cada sexo. En general, se observó que cuando el estrés se ejerce durante la gestación temprana, afecta principalmente el comportamiento de los machos, mientras que el estrés durante el período gestacional tardío influye predominantemente en el comportamiento de las hembras <sup>155</sup>. Sin embargo, la razón por la cuál machos y hembras resultan ser más vulnerables o resistentes y la contribución de los mecanismos hormonales intervinientes, aún hoy, no se han clarificado <sup>156</sup>.

El efecto diferencial del estrés prenatal sobre machos y hembras probablemente tenga una base fisiológica que se determina en el desarrollo intrauterino. Sin embargo, las diferencias sexuales no son consistentes en términos de la dirección y la previsibilidad de los resultados en la descendencia <sup>157-159</sup>.

Por otro lado, el modo en que el estresor es percibido puede jugar un papel importante en los efectos del estrés prenatal. El modo en que un individuo afronta el estrés determina la respuesta fisiológica y comportamental al mismo

Por otra parte, en ratones, las cepas C57BL/6J y BALB/c presentan características disímiles en relación con su respuesta al estrés y la dieta. La primera es ampliamente utilizada en modelos de desórdenes metabólicos inducidos por dieta, debido a su susceptibilidad ante la ingesta de una dieta rica en grasas y, además, esta cepa demostró ser más resistente al estrés que la cepa BALB/c. Mientras que los ratones de la cepa BALB/c son susceptibles al estrés, pero resistentes a la obesidad inducida por la dieta rica en grasas <sup>160-162</sup>.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPÓTESIS

Postulamos que los ratones de las distintas cepas (C57BL/6J y BALB/C) mostrarán diferente susceptibilidad a desarrollar insulino-resistencia luego de haber sido sometidos a estrés prenatal (EP) y, posteriormente, alimentados con una dieta rica en grasas (DG). Además, suponemos que esta diferencia de susceptibilidades se verá reflejada en el nivel de expresión de genes relacionados con la vía inflamatoria, el metabolismo energético y la acción de la insulina.

### OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es estudiar si la programación fetal por restricción del movimiento durante la gestación produce distinta susceptibilidad a desarrollar alteraciones metabólicas en las crías, luego de ser desafiadas durante su vida adulta con una dieta grasa y, si esto se ve reflejado a nivel de la expresión génica, evaluando distintos genes relacionados con la inflamación, el metabolismo energético y la acción de la insulina.

#### *Objetivos específicos:*

Se trabajará con crías provenientes de madres sometidas a estrés durante la gestación y que, luego del destete, serán alimentadas con dieta normal o dieta de alta energía. Como control se utilizarán crías de madres no estresadas. En las crías se procederá a:

- 1) Caracterizar el modelo de estrés gestacional y el efecto de la dieta grasa sobre el peso corporal, la curva de tolerancia a la glucosa y el test de sensibilidad a la insulina.
- 2) Evaluar a nivel bioquímico el modelo, determinando los siguientes parámetros en plasma: triglicéridos, colesterol, insulina y corticosterona.

- 3) Analizar la expresión en los tejidos blanco para insulina (tejido adiposo, hígado y músculo esquelético) de genes involucrados en el metabolismo, la inflamación y la homeostasis de la glucosa.
  
- 4) Evaluar si los ítems anteriores presentan diferencias entre dos cepas de ratones que presentan distinto "background" genético (C57BL/6J y BALB/c) y que, como ya fuera mencionado, muestran distinta susceptibilidad al estrés y a la ingesta de una dieta de alta energía. Asimismo, evaluar si hay diferencias entre sexos dentro de una misma cepa.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ANIMALES

Se utilizaron ratones de ambos sexos de las cepas endocriadas C57BL/6J y BALB/c. Los ratones fueron criados en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED, UCA-CONICET, Buenos Aires, Argentina) según la “Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” (NIH) (revisión 2011). El protocolo de experimentación utilizado fue aprobado por el Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL, BIOMED, CONICET-UCA, resolución N°007/2016). Los ratones fueron mantenidos en un ciclo de 12:12 horas luz:oscuridad con temperaturas controladas de entre 20 y 24° C. Los animales tuvieron acceso a agua y alimento *ad libitum*.

### MODELO DE ESTRÉS PRENATAL

Se utilizaron ratones hembra, preñadas, de las cepas C57BL/6J y BALB/c de 12-16 semanas de edad. Las hembras gestantes, fueron alojadas en forma individual con libre acceso al agua y al alimento. A partir del día 14 de gestación los animales fueron divididos en dos grupos según el tratamiento recibido, el cual se extendió hasta el día del parto:

- 1) Estresadas por inmovilización (EP), durante 7 días consecutivos de 10 a 12 AM.
- 2) No estresadas (NEP), mantenidas sin ninguna perturbación.

#### *Estrés por inmovilización*

Las hembras preñadas fueron sometidas a estrés por inmovilización durante la última semana de gestación (día 14 al 21). Para esto, los animales fueron colocados dentro de un envase de polipropileno de 4 cm de diámetro por 10 cm de largo (con ventilación adecuada) durante 2 horas, todos los días en el mismo horario (de 10-12AM). Cabe aclarar que en este recipiente los animales no se comprimen físicamente.

Luego del nacimiento, los ratones fueron sexados y las camadas fueron reducidas a 8 animales tratando de mantener igual proporción de hembras y machos. A los 21 días de vida los ratones fueron destetados. Se los alojó en

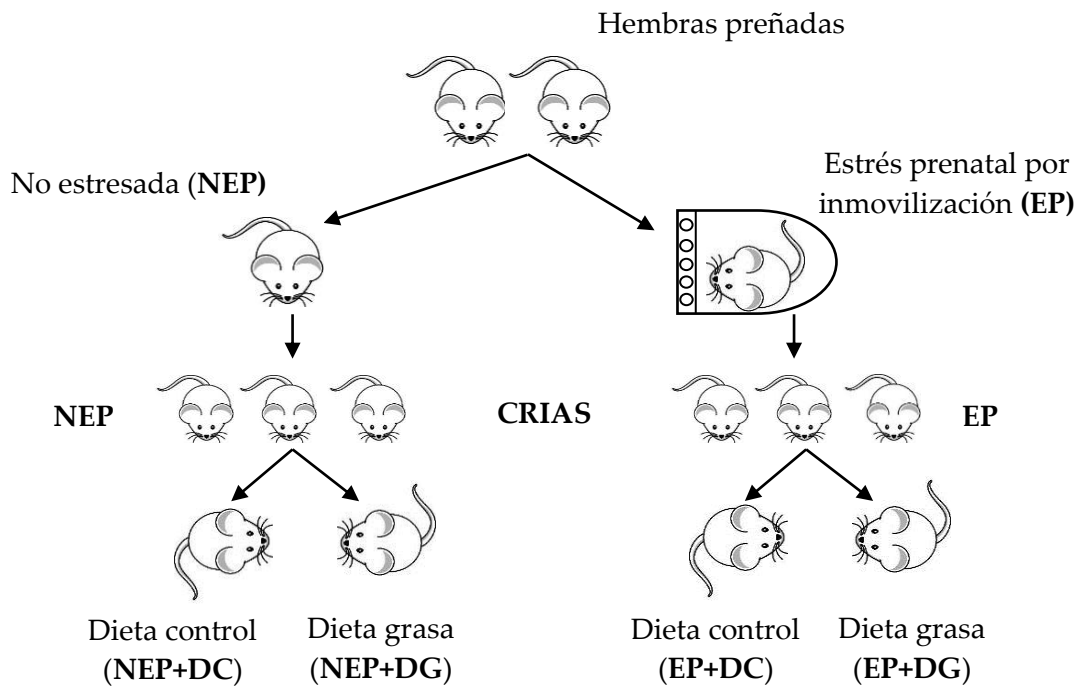
grupos de 4 animales del mismo sexo. En la cuarta semana de vida, las crías fueron divididas en 2 grupos y recibieron distintas dietas:

A) Dieta grasa (DG), de alto contenido calórico.

B) Dieta control (DC).

Entonces, los grupos experimentales utilizados para cada cepa y sexo fueron los siguientes (ver figura 7):

- 1) no estresados prenatalmente (NEP) + dieta control (DC)
- 2) no estresados prenatalmente (NEP) + dieta grasa (DG)
- 3) estresados prenatalmente (EP) + dieta control (DC)
- 4) estresados prenatalmente (EP) + dieta grasa (DG)



**Figura 7: esquema representativo del protocolo experimental utilizado.**

Durante todo el experimento se registró el peso corporal de los animales en forma semanal.

#### *Preparación de la dieta rica en grasas*

El alimento se preparó en el laboratorio de la siguiente manera: utilizando el alimento standard rata-ratón (Cooperación, San Nicolás, Buenos Aires), se

partieron los pellet por la mitad y se mezclaron con manteca y grasa porcina (derretidas). La DG se realizó teniendo en cuenta el porcentaje de kilocalorías sugerido por “American Institute of Nutrition Rodents Diets” (AIN) <sup>163</sup>, el detalle nutricional de cada dieta se detalla en la tabla 2. Este alimento es utilizado en el laboratorio en forma habitual sin inconvenientes.

	Dieta Control		Dieta grasa	
	Gramos	% Kcal	Gramos	% Kcal
<b>Proteínas</b>	25,12	33,93	17,06	14,82
<b>Hidratos de Carbono</b>	32,05	43,28	21,53	18,71
<b>Grasas</b>	7,5	22,79	34,00	66,47
* <b>Saturadas</b>	32,45%		52,90%	
* <b>Monoinsaturadas</b>	27,86%		35,20%	
* <b>Poliinsaturadas</b>	39,69%		11,91%	

Tabla 2: Valores nutricionales del alimento utilizado.

## DETERMINACIONES FISIOLÓGICAS

### *Test de tolerancia a la glucosa (TTG)*

A las 24 semanas de edad se realizó el TTG; para ello los animales fueron ayunados por 6 h (durante el ciclo de luz, de modo de minimizar el estrés), y se les inyectó en forma intraperitoneal D-glucosa (2mg/kg, J.T.Baker, NJ, EEUU) resuspendida en buffer fosfato estéril. Se determinó la glucemia a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos post-inyección (figura 8), utilizando un glucómetro personal (Accu-check Performa, Roche) a partir de la sangre procedente de la cola de los ratones. Se siguieron las recomendaciones de McGuinness <sup>164</sup>.

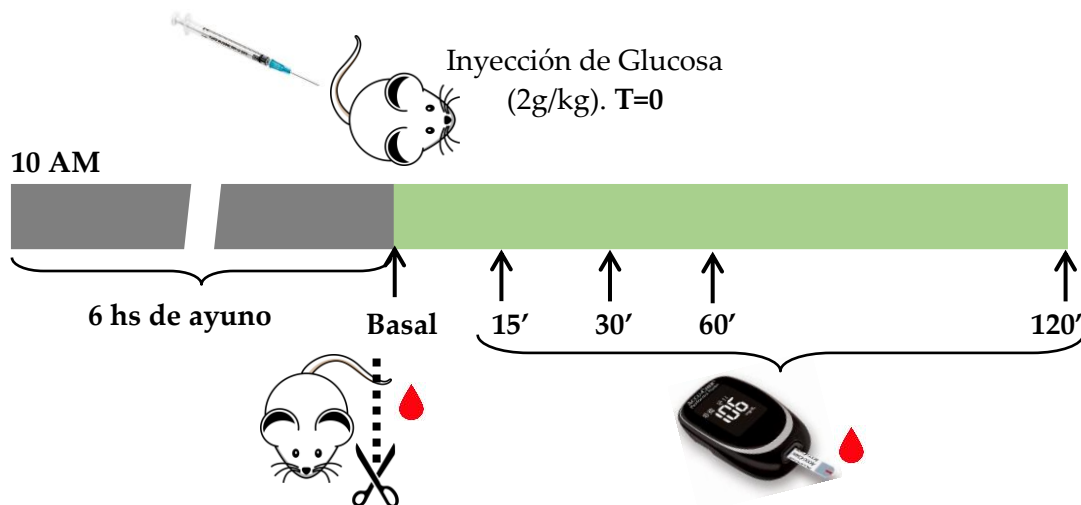
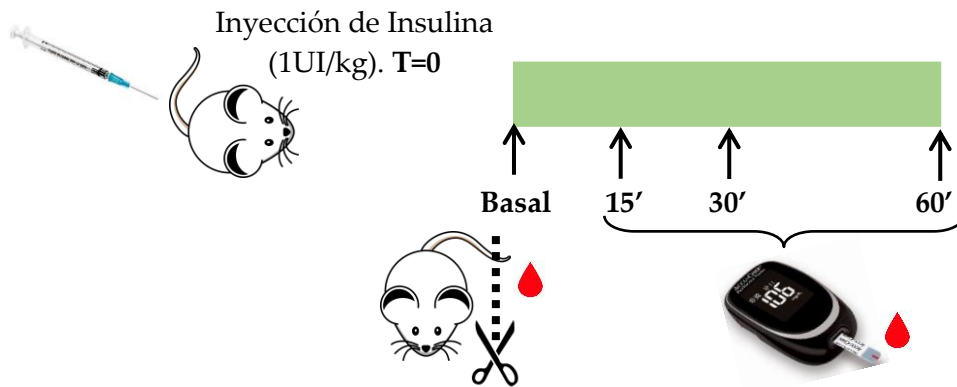


Figura 8: representación esquemática del protocolo de la curva de tolerancia a la glucosa. Luego de 6 h de ayuno durante el periodo de luz, se corta el extremo de la cola de los animales

de modo de obtener una gota de sangre para la determinación de la glucemia basal utilizando un glucómetro personal. Luego, se inyecta en forma intraperitoneal 2g glucosa/kg peso corporal, resuspendida en 0.1mL de buffer fosfato estéril (t=0) y se toman muestras de sangre de la cola a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos post inyección.

### ***Test de sensibilidad a la insulina (TSI)***

A las 25 semanas de edad se realizó el TSI; en este caso a los animales no ayunados, a los que se les inyectó 1UI insulina humana recombinante de corta duración/kg de peso corporal (insuman-R, Sanofi-Aventis, Alemania). Se determinó la glucemia a los 0, 15, 30 y 60 minutos post-inyección (figura 9), utilizando un glucómetro personal (Accu-chek Performa, Roche) a partir de la sangre procedente de la cola de los animales. También en este caso se siguieron las recomendaciones de McGuinness <sup>164</sup>.



**Figura 9:** representación esquemática del protocolo del test de sensibilidad a la insulina (TSI). Sin realizar ayuno previo, se corta el extremo de la cola de los animales a fin de obtener una gota de sangre para la determinación de la glucemia basal, utilizando un glucómetro personal; luego, se inyecta en forma intraperitoneal 1UI insulina/kg de peso corporal, diluida en buffer fosfato estéril, de modo de inyectar 0.1mL (t=0) y se toman muestras de sangre de la cola a los 0, 15, 30 y 60 minutos post inyección.

## **DETERMINACIONES BIOQUIMICAS Y MOLECULARES**

### ***Sacrificio de los animales***

Al momento del sacrificio (28 semanas de edad), los ratones fueron anestesiados en cámara de CO<sub>2</sub> y, posteriormente, sangrados a blanco a través del seno retro-orbital. Las muestras de sangre fueron recolectadas en hielo en tubos con 30 µL de EDTA 0,25 M y se centrifugaron durante 10 minutos a 500 xg en centrifuga refrigerada a 4 °C, separando de esta manera el plasma. Además, a los animales se les extrajo el hígado y el tejido adiposo abdominal

los que se les registró el peso total y, luego, se los guardó en dos porciones. También se obtuvo el músculo esquelético (cuadriceps) que, junto con todos los tejidos y el plasma, se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su procesamiento. También se registró la longitud cabeza-ano de todos los animales.

### ***Determinaciones bioquímicas***

#### *Determinación de los niveles de colesterol total y triglicéridos*

Se determinó el colesterol total (Colestat enzimático, Wiener lab, Rosario, Argentina) y los niveles de triglicéridos (TG color GPO/PAP AA líquida, Wiener lab, Rosario, Argentina), el protocolo del fabricante fue modificado para ser desarrollado en placas de ELISA de 96 pocillos utilizando un volumen final de reacción de 300  $\mu\text{L}$ .

#### *Determinación de los niveles de insulina por ELISA*

Para determinar los valores de insulina plasmática se utilizó un kit de ELISA (Mercodia Mouse Insulin ELISA). Se siguieron las instrucciones del fabricante. Este kit presenta un coeficiente de variación (CV) de 3.1% intra-ensayo.

#### *Determinación de los niveles de corticosterona*

Se determinaron los niveles de corticosterona por medio de Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (UHPLC, Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000), modalidad isocrática, con detector de absorción UV/visible de acuerdo a Viljoen, F.P *et al.*<sup>165</sup>. *Purificación:* Se realizó una extracción de la muestra con diclorometano. Brevemente, se colocaron 60  $\mu\text{L}$  de la muestra en 140  $\mu\text{L}$  de buffer B (Tris.HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M, albúmina de suero bovino BSA 0,1) y se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), se agitó, se dejó reposar la emulsión y se transfirió la fase orgánica a tubos nuevos. Se repitió el proceso y, posteriormente, los extractos fueron secados en una centrífuga de evaporación SpeedVac (Thermo Scientific) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

*Ensayo:* Se utilizó una columna C18 Luna (2) (150  $\times$  4,6 mm ID, de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula) marca Phenomenex, que fue estabilizada con la fase móvil agua: acetonitrilo: ácido acético glacial (65:35:0.5 v/v) a un pH entre 4.10 y 4.20. Las muestras se resuspendieron en 250  $\mu\text{L}$  de la fase móvil. La separación cromatográfica se realizó a  $24^{\circ}\text{C}$  de temperatura. Debido a las características del



equipo se inyectó un volumen fijo de 50  $\mu\text{L}$  de muestra. La cromatografía se realizó con un flujo constante de 1 mL/min. El tiempo de elución total fue de 15 minutos por muestra, con un tiempo de elución de la corticosterona de 9.5 min. Se utilizó acetonitrilo calidad HPLC de J.T. Baker, ácido acético glacial grado analítico de Merck y agua ultrapura. Se preparó una solución madre de estándar de corticosterona, de la cual se hicieron diluciones para cuantificar las muestras y determinar la linealidad del método. La detección e identificación de corticosterona se llevó a cabo con un detector UV/VIS a 245 nm.

### *Determinaciones moleculares*

Extracción de RNA: Se homogeneizaron los tejidos en 1 mL de Trizol (tri-reagent® – Molecular Research Center, Inc.) utilizando un homogeneizador Ultraturrax (IKA) y se colocaron los homogenatos en hielo dejándolos, luego, a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, se agregó cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), los tubos se agitaron vigorosamente, se colocaron en hielo y, luego, se dejaron 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 4 °C por 15 min a 12000 x g. Luego, se transfirió la fase acuosa a tubos estériles y se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol (Biopack® – Zarate, Bs. As. - Argentina), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Pasado ese tiempo, se centrifugaron con refrigeración por 15 min a 12000 x g. Posteriormente, se removió el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 mL de etanol al 75% (Dorwil). Luego, se agitó en vortex y centrifugó con refrigeración a 7500 x g durante 10 min. Se descartó el sobrenadante, se dejó secar el pellet al aire por 10 min y se resuspendió en agua libre de RNAsas. La cuantificación del RNA obtenido se realizó utilizando el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) a través de la medición de la absorbancia a 260 nm.

Transcripción Reversa: Se realizó una retrotranscripción del RNA para obtener el DNAc. Para ello, en cada reacción se colocaron 3,5  $\mu\text{g}$  de RNA de cada muestra, 0,8  $\mu\text{L}$  de “primers” al azar, 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (Invitrogen) y el volumen de  $\text{H}_2\text{O}$  necesario para alcanzar un volumen final de 10,2  $\mu\text{L}$ . Los tubos de reacción se incubaron por 5 min a 65 °C. Se colocaron en hielo y se agregó a cada uno 4  $\mu\text{L}$  de Buffer First Strand, 2  $\mu\text{L}$  de DTT y 0,5  $\mu\text{L}$  del inhibidor de RNasa (RNAsin, Genbiotech). Los tubos se colocaron en el termociclador (Applied Biosystem Veriti Thermal Cycler) por 2 min a 37 °C. Luego, se colocaron en hielo y se agregó 1  $\mu\text{L}$  de M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen, California - USA). Se colocaron nuevamente en el termociclador, con el siguiente programa: 10 min a

25 °C, 50 min a 37 °C y 15 min a 70 °C. El DNAC obtenido se guardó a -20 °C hasta ser usado.

**Real time RT-PCR:** Las reacciones de PCR en Tiempo Real se llevaron a cabo en un termociclador ABI7500 (Applied Biosystems) usando el kit comercial “FastStart Universal SYBR Green Master (ROX, Roche). Cada reacción fue realizada por duplicado, en un volumen final de 20 µL, utilizando como templado 4 µL de DNAC diluido (dilución 1:5 de la reacción de transcripción reversa).

Al inicio de la reacción de PCR se desnaturalizó el DNAC a 95 °C durante 5 min. Esto fue seguido por 40 ciclos de 10 seg a 95 °C, 15 seg a 58-63 °C (según el par de “primers”: tabla 3) y 20 seg de extensión a 72 °C. Finalizado este ciclo se realizó una curva de “melting”.

Las secuencias de los “primers” fueron diseñadas usando el software Primer3 (versión 2.2.3) (Integrated DNA Technologies). Los “primers” fueron localizados preferentemente en uniones exón-exón o en dos exones diferentes que tuvieran un intrón entre medio para evitar que se transcriba el DNA genómico y diseñados de manera que los amplicones tuvieran 100-300 pb de longitud (tabla 3). Los oligonucleótidos utilizados en estos ensayos fueron comprados a Life Technologies o IDT (Biodynamics).

Todas las muestras de DNAC de tejido adiposo fueron comparadas contra el gen de referencia (“housekeeping”) GAPDH, mientras que en el caso del hígado y el músculo esquelético se utilizó como gen de referencia Ciclofilina A ó B (PPIA PPIB). La elección del gen de referencia se realizó utilizando el programa geNorm (versión 3.5) <sup>166</sup>. Para la determinación de la relación de expresión entre el gen de interés y el “housekeeping” correspondiente, se utilizó el programa LinRegPCR versión 2018.0 <sup>167-169</sup> que permite, a partir de los datos de fluorescencia crudos que arroja el termociclador, calcular la eficiencia de cada gen. Con este dato se realizó el cálculo de la relación utilizando la fórmula de  $E_{\text{gen}}^{Ct_{\text{gen}}}/E_{\text{HK}}^{Ct_{\text{HK}}}$ , donde E es la eficiencia de reacción, HK: el gen de referencia o “housekeeping”, Ct: número de ciclos en alcanzar el “threshold” y el gen: es el gen de interés a medir <sup>168</sup>.

Gen	Secuencias	Amplicon (pb)	T° “annealing”
<b>Adiponectina</b>	Fw: 5'-GATGGCAGAGATGGCACTCC-3' Rv: 5'-GAGCGATACACATAAGCGGC-3'	173	60

<b>Resistina</b>	Fw: 5'-TGTCCTGCTAAGTCCTCTGC-3' Rv: 5'-CAAGACTGCTGTGCCTTCTG-3'	256	60
<b>Leptina</b>	Fw: 5'-AGCTGCAAGGTGCAAGAAGA-3' Rv: 5'-GGATACCGACGTGTGTGAAATG-3'	193	60
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Fw: 5'-GCCACCTTTTGACAGTGATG-3' Rv: 5'-AGTGATACTGCCTGCCTGAA-3'	165	58
<b>IL-4</b>	Fw: 5'-GGGACGCCATGCACGGAGATG-3' Rv: 5'-TGCGAAGCACCTTGGAAGCCC-3'	100	58
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fw: 5'-GGGTGATCGGTCCCCAAAG-3' Rv: 5'-TGAGATCCATGCCGTTGGC-3'	159	60
<b>SIRT1</b>	Fw: 5'-GCAGGTTGCAGGAATCCAAA-3' Rv: 5'-CTGGCTTCATGATGGCAAGTG-3'	176	62
<b>SIRT3</b>	Fw: 5'-GCGTTGTGAAACCCGACATT-3' Rv: 5'-CAGTCGGGGCACTGATTTCT-3'	170	62
<b>SOCS3</b>	Fw: 5'-CTCTTACGACCGCTGTCTCTC-3' Rv: 5'-CATCCCGGGGAGCTAGT-3'	292	60
<b>FOXO1</b>	Fw: 5'-TCAAGGATAAGGGCGACAGC-3' Rv: 5'-GCCCTCGGCTCTTAGCAAAT-3'	216	62
<b>PPAR-<math>\alpha</math></b>	Fw: 5'-TGTGGCTGGTCAAGTTCGG-3' Rv: 5'-CCAGAGCTCTCCTCACCGAT-3'	220	58
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	Fw: 5'-CCCTGGCAAAGCATTGTAT-3' Rv: 5'-GAAACTGGCACCCCTTGAAAA-3'	225	62
<b>PGC1-<math>\alpha</math></b>	Fw: 5'-CGGAAATCATATCCAACCAGTACA-3' Rv: 5'-TGAGAACCGCTAGCAAGTTTG-3'	93	60
<b>PGC1-<math>\alpha</math> IsoA</b>	Fw: 5'-GGGACATGTGCAGCCAAGA-3' Rv: 5'-AAGAGGCTGGTCCTCACCAA-3'	74	60
<b>GLUT-4</b>	Fw: 5'-GGGTGGCATGATCTCTTCCTT-3' Rv: 5'-CAGCATAGCCCTTTTCCTTCC-3'	70	60
<b>GAPDH</b>	Fw: 5'-CGTCCCGTAGACAAAATGGT-3' Rv: 5'-GAATTTGCCGTGAGTGGAGT-3'	177	60
<b>PPIA</b>	Fw: 5'-CAACCCACCGTGTTCTTC-3' Rv: 5'-GCTCGAAAGTTTTCTGCTGTCT-3'	108	60
<b>PPIB</b>	Fw: 5'-CGAGTCGTCTTTGGACTCTTT-3' Rv: 5'-GCCAAATCCTTTCTCTCCTGTA-3'	87	58

**Tabla 3:** “Primers” utilizados para la determinación de distintos genes relacionados con la inflamación, el metabolismo energético y la insulino- resistencia en hígado, tejido adiposo y músculo esquelético. Se muestra el gen, la secuencia en sentido 5' a 3', los pares de bases del amplicón y la temperatura de “annealing” o hibridación.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . Se controló que las variables continuas tuvieran una distribución normal y cumplieran con la homogeneidad de varianzas mediante los tests de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Las variables que no cumplieran con alguno de los criterios fueron transformadas mediante la aplicación de logaritmo. Las diferencias estadísticas entre las medias fueron evaluadas mediante un ANOVA de uno o varios factores con o sin medias repetidas, según correspondiese. Utilizamos el programa CSS/Statistica V6.0 (Tulsa, USA) para realizar los análisis mencionados.

# RESULTADOS

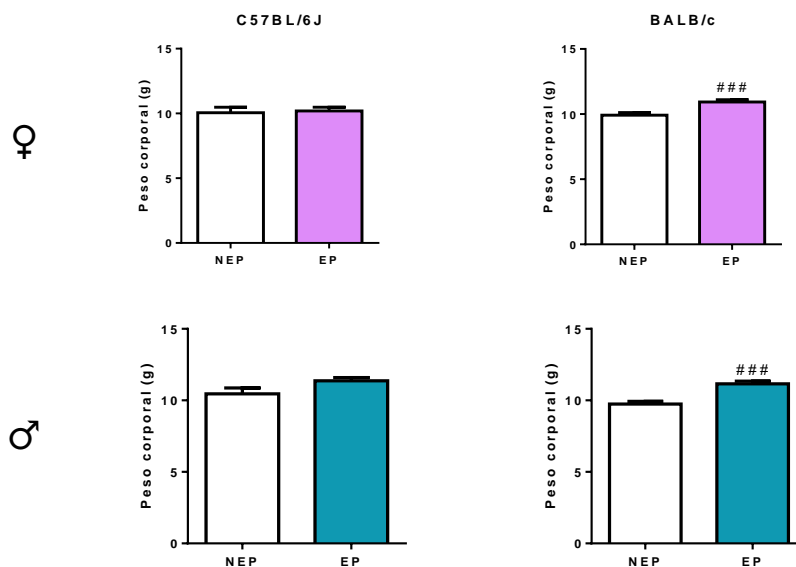
## RESULTADOS

Los resultados se presentan divididos en dos partes: primero se mostrarán todos los efectos producidos por el estrés prenatal (EP) en los ratones que consumieron una DC; y en la segunda parte sobre los mismos parámetros anteriormente expuestos se agregará el efecto del consumo de una DG. De esta forma, se podrá observar de una manera más fácil y ordenada los efectos del tratamiento prenatal y el posterior desafío postnatal (consumo de DG).

### PARTE IA: CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE ESTRÉS PRENATAL A NIVEL FISIOLÓGICO

#### *Peso al destete*

Los animales de ambas cepas fueron destetados a los 21 días de vida y se registró el peso corporal de cada uno. En la figura 10 se observa el peso al destete de los animales de la cepa C57BL/6J y BALB/C. Sólo los animales EP de la cepa BALB/C mostraron un aumento significativo del peso corporal, independientemente del sexo.

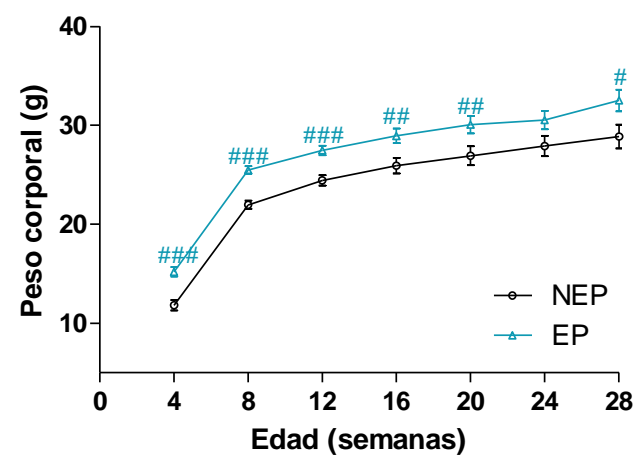
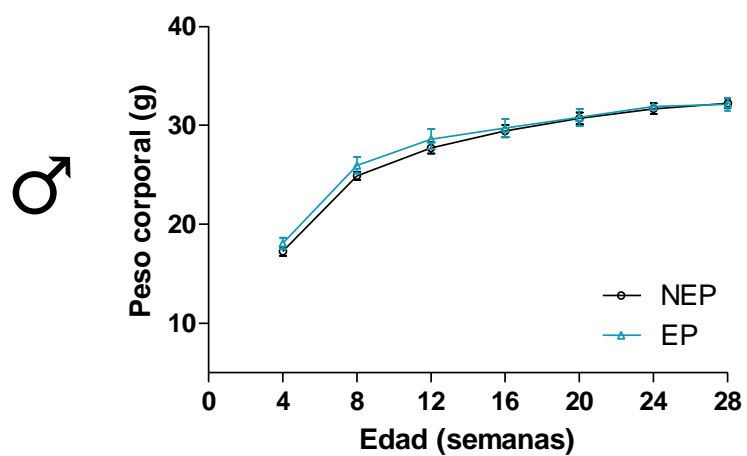
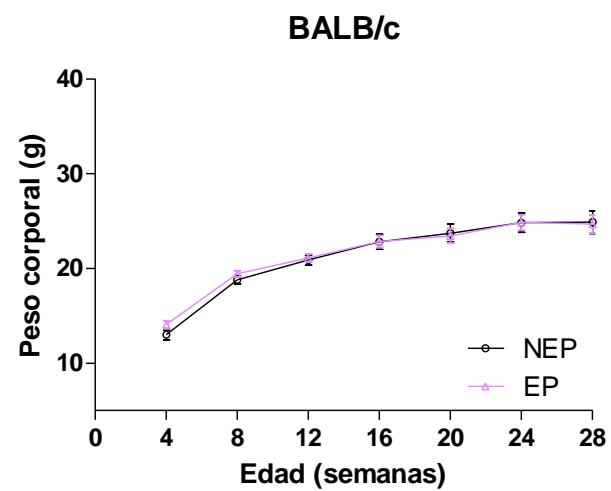
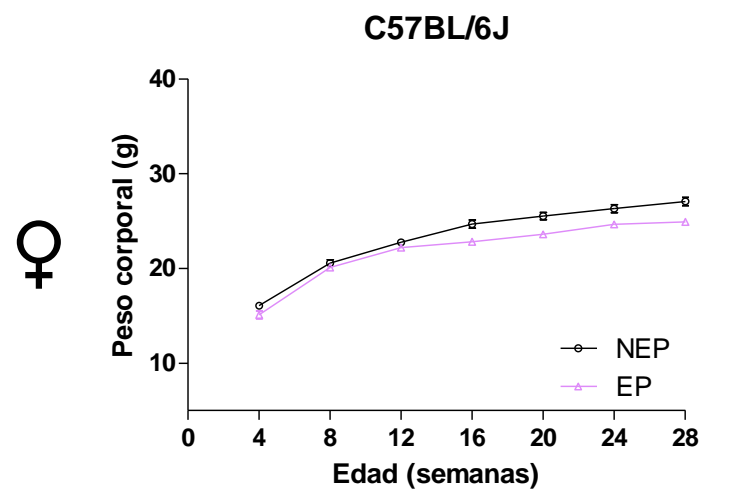


**Figura 10: Peso corporal al destete (21 días).** En el gráfico se observa el peso de los animales de la cepa C57BL/6J (izquierda) y BALB/C (derecha); arriba: hembras, abajo: machos. NEP, animales no estresados prenatalmente; EP, animales estresados prenatalmente. Los animales utilizados por grupo fueron N=11 C57BL/6J y N=17 BALB/C. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. ### $p < 0.001$  respecto NEP.

*Peso corporal desde la 4<sup>ta</sup> hasta la 28<sup>va</sup> semana de vida.*

Los animales NEP y EP fueron alimentados con una DC y, a partir de la 4ta semana de vida, se registró su peso corporal semanalmente hasta la semana 28, momento en el que fueron sacrificados.

En la figura 11 se pueden observar los gráficos correspondientes a las distintas cepas separados por sexo. No se observaron diferencias de peso entre los animales NEP vs EP en la cepa C57BL/6J. En la cepa BALB/c, puede observarse un aumento significativo y sostenido del peso corporal debido al estrés prenatal en los machos durante todo el tiempo que se extendió el experimento (NEP vs EP  $p < 0.001$ ). Mientras que las hembras de esta cepa no mostraron variaciones debidas al tratamiento prenatal efectuado.

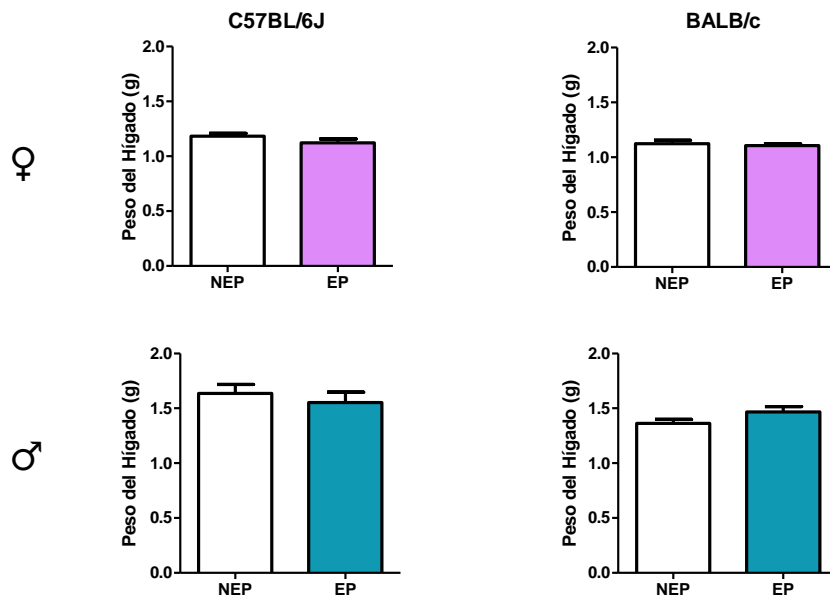




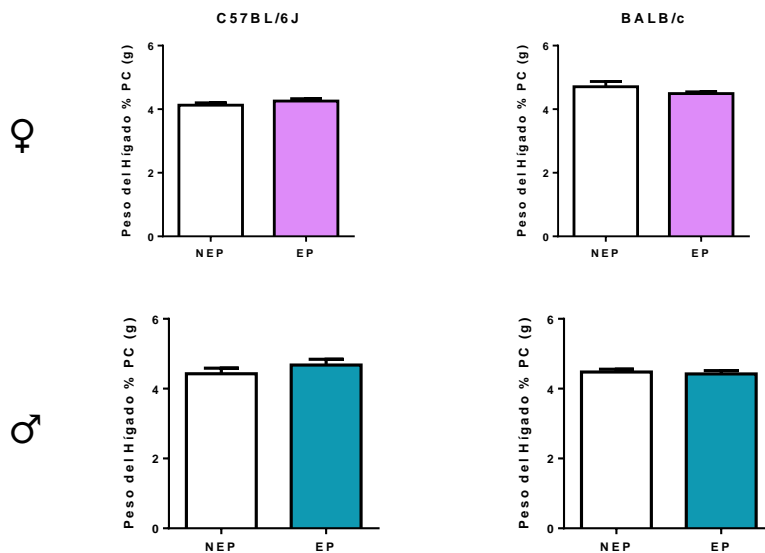
**Figura 11: Peso corporal de los ratones C57BL/6J y BALB/C alimentados con dieta control desde las 4 hasta las 28 semanas de edad.** Izquierda: cepa C57BL/6J, Derecha: cepa BALB/C; Arriba: hembras; Abajo: machos. ###p < 0.001, ##p < 0.01, #p < 0.05 respecto NEP. Los animales utilizados por grupo fueron N=5 para la cepa C57BL/6J y N=8 para la cepa BALB/C. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.

### Peso del hígado

En la figura 12, se muestra el peso del hígado y en la figura 13 el peso relativo del hígado. En ambos casos, ninguna de las dos cepas mostró cambios significativos del peso de este órgano debido al tratamiento prenatal al que fueron sometidos.



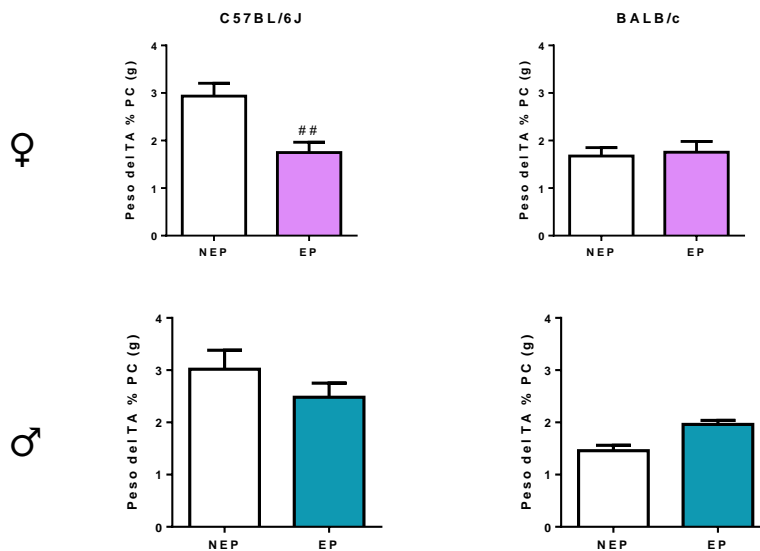
**Figura 12: Peso del hígado.** A la izquierda cepa C57BL/6J, derecha BALB/c. Panel superior hembras, inferior machos. Los datos están expresados como media  $\pm$  error standard de la media. El N utilizado fue de 6 animales por grupo para la cepa C57BL/6J y de 8 para los BALB/c.



**Figura 13: Peso relativo del hígado.** Expresado como la relación entre el peso del órgano y el peso corporal multiplicada por 100. A la izquierda cepa C57BL/6J, derecha BALB/c. Panel superior hembras, inferior machos. Los datos están expresados como media  $\pm$  error standard de la media. El N utilizado fue de 6 animales por grupo para la cepa C57BL/6J y de 8 para los BALB/c.

### *Peso relativo del Tejido Adiposo Abdominal*

En la figura 14, se observa que el peso del tejido adiposo abdominal de las hembras C57BL/6J que fueron estresadas prenatalmente, tienen menor peso relativo del tejido adiposo que aquellas que no fueron estresadas prenatalmente ( $p < 0.01$ ).

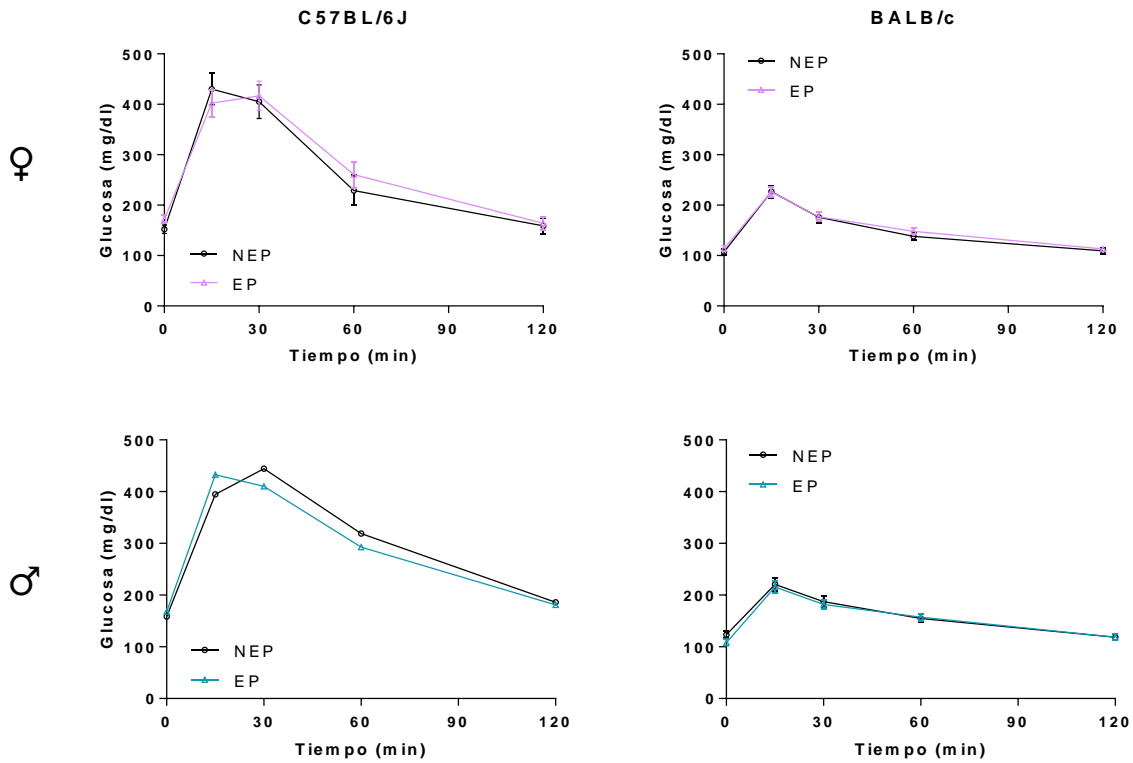


**Figura 14: Peso relativo del tejido adiposo abdominal.** Expresado como la relación entre el peso del tejido adiposo y el peso corporal multiplicada por 100. A la izquierda cepa C57BL/6J, derecha BALB/c. Panel superior hembras, inferior machos. <sup>##</sup> $p < 0.01$  respecto NEP. Los datos están expresados como media  $\pm$  error standard de la media. El N utilizado fue de 6 animales por grupo para la cepa C57BL/6J y de 8 para los BALB/c.

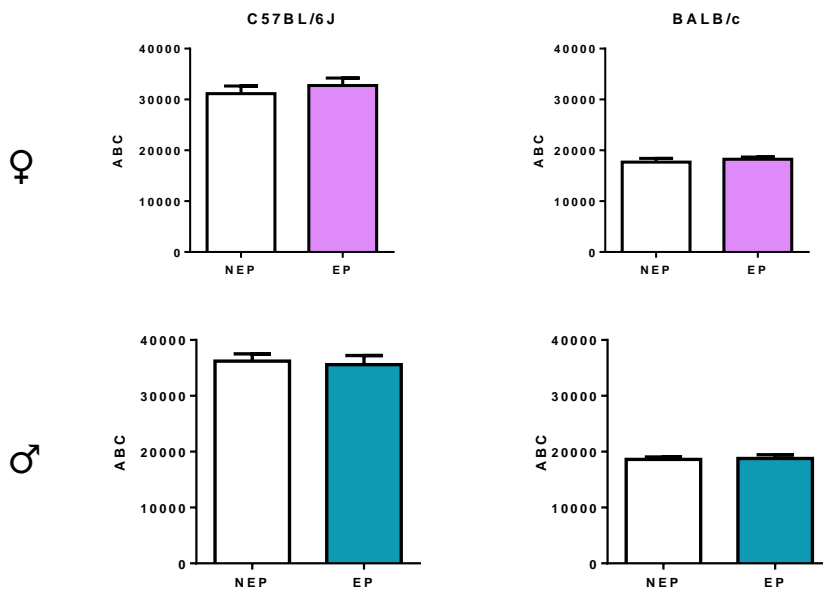
### *Curva de tolerancia a la glucosa*

A las 24 semanas de edad se realizó una curva de tolerancia a la glucosa; en la figura 15 se observan las glucemias de los ratones a distintos tiempos, luego de una inyección intraperitoneal de glucosa (2 g/kg). En ninguna de las dos cepas se observaron cambios significativos en la curva de glucemia debidos al EP.

Los gráficos de la figura 16 representan el área bajo la curva de este ensayo y, al igual que en la figura 15, no se observan cambios significativos debidos al tratamiento prenatal en ninguna de las dos cepas.



**Figura 15: Curva de tolerancia a la glucosa a las 24 semanas de vida.** Los ratones fueron ayunados durante 6 horas en el período de luz y, luego, se les inyectó intraperitonealmente una dosis de 2g de D-glucosa/kg de peso corporal, disuelta en buffer fosfato estéril. Se observan las glucemias a los 15, 30, 60 y 120 minutos post inyección de glucosa. A la izquierda cepa C57BL/6J, derecha BALB/C, panel superior hembras, inferior machos. El N utilizado por grupo fue de 5 animales para la cepa C57BL/6J y 8 para la cepa BALB/C. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.

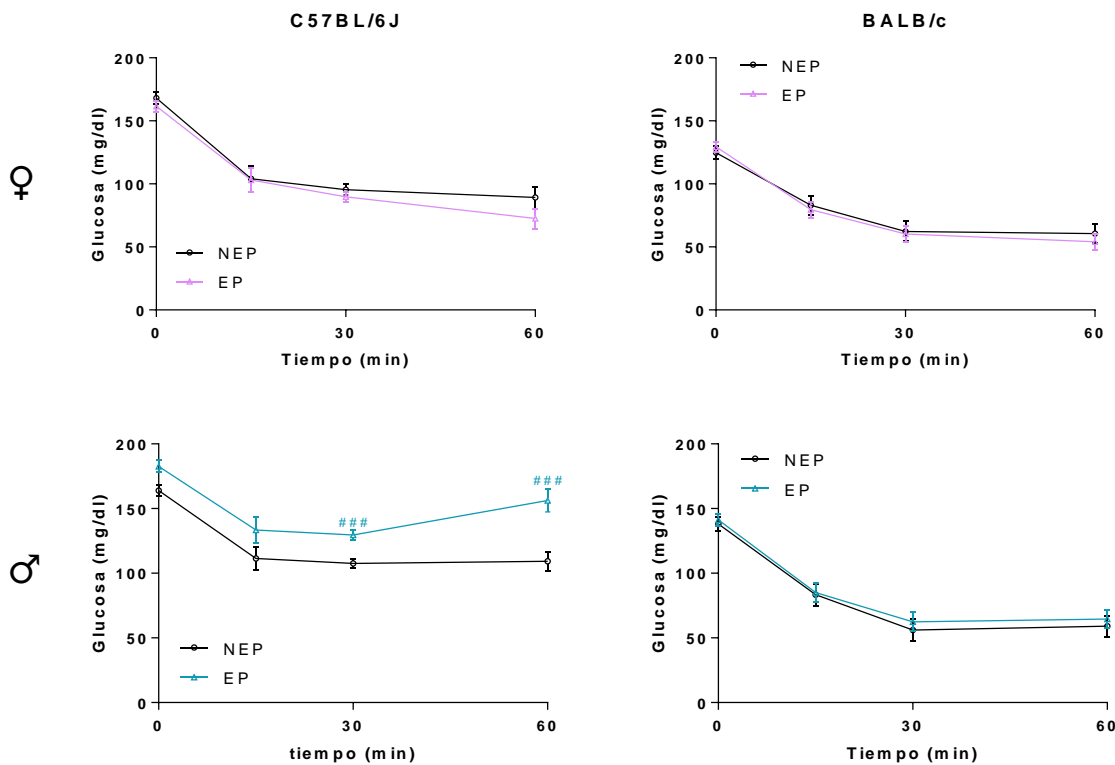


**Figura 16: Área bajo la curva de tolerancia a la glucosa.** Se representan el área bajo la curva (ABC) correspondiente a las curvas de glucemia al realizar el ensayo de tolerancia a la glucosa y registrar las glucemias a distintos tiempos. NEP: no estresado prenatalmente; EP: estresado prenatalmente. Los animales utilizados por grupo fueron N=5 para la cepa C57 y N=8 para la cepa BALB/C. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES.

**Test de sensibilidad a la insulina**

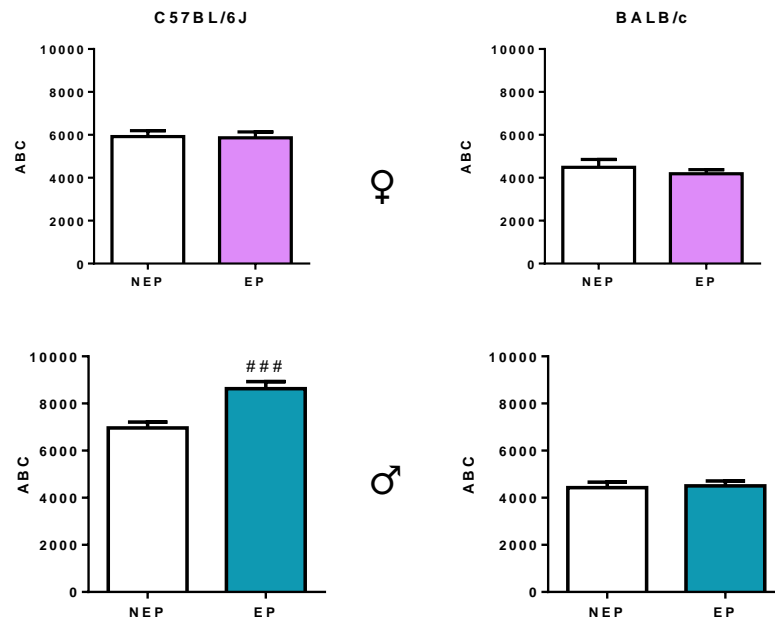
En la semana posterior al ensayo de la curva de tolerancia a la glucosa se realizó el test de sensibilidad a la insulina. A los animales no ayunados se les inyectó intraperitonealmente insulina (1UI/kg) y se registró la glucemia a distintos tiempos. Los resultados están representados en la figura 17. Los machos EP de la cepa C57BL/6J muestran una curva alterada, con glucemias mayores a las del control a los 30 y 60 minutos post inyección ( $p < 0.001$ ).

Al analizar el área bajo la curva de este test (figura 18), se observa, en concordancia con lo que se observó en el gráfico anterior, que los machos EP C57BL/6J presentan un área bajo la curva mayor respecto de los que no fueron EP ( $p < 0.001$ ).



**Figura 17: Test de sensibilidad a la insulina a las 25 semanas de vida.** Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de insulina humana de corta duración (1 UI/kg) disuelta en buffer fosfato estéril. Se observan las glucemias a los 15, 30 y 60 minutos post inyección de insulina. A la izquierda cepa C57BL/6J, derecha BALB/C, panel superior hembras, inferior machos. ### $p < 0.001$

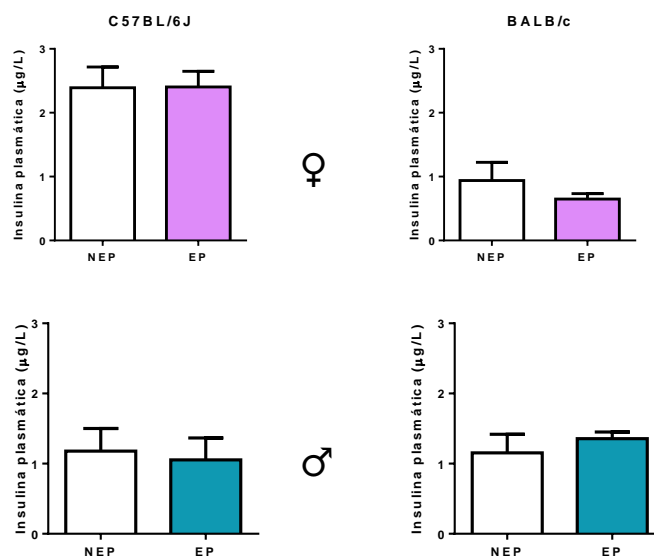
0.001 respecto NEP. Cepa C57BL/6J N=5 y BALB/c N=8. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.



**Figura 18: Área bajo la curva del test de sensibilidad a la insulina.** Se representa el área bajo la curva (ABC) correspondiente a las curvas de glucemia al realizar el test de sensibilidad a la insulina y registrar las glucemias a distintos tiempos. ### $p < 0.001$  respecto NEP. Los animales utilizados por grupo fueron N=5 para la cepa C57BL/6J y N=8 para la cepa BALB/C. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.

### *Insulina plasmática*

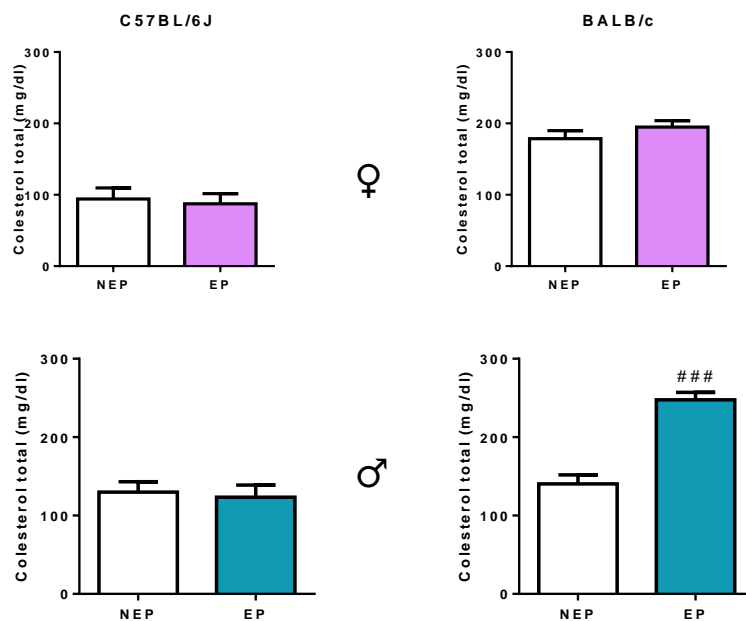
Como se muestra en la figura 19, no registramos diferencias significativas en los niveles de insulina plasmática debidas al tratamiento prenatal realizado.



**Figura 19: Concentración de insulina en plasma.** Se determinó mediante ELISA la insulina plasmática de los ratones de 28 semanas de edad no ayunados. A la izquierda cepa C57BL/6J, derecha BALB/c. Panel superior hembras, inferior machos. Los datos están expresados como media  $\pm$  error standard de la media. El N utilizado fue de 4 animales por grupo para cada cepa.

### *Colesterol total*

En la figura 20 se observa el colesterol total medido en plasma. Los machos EP BALB/c tienen el colesterol total aumentado significativamente, al compararlos con el grupo NEP ( $p < 0.001$ ).



**Figura 20: Colesterol plasmático total determinado en el plasma obtenido al momento del sacrificio (28 semanas de vida).** A la izquierda cepa C57BL/6J, derecha BALB/c. Panel superior hembras, inferior machos. ### $p < 0.001$  respecto NEP. Los datos están expresados como media  $\pm$  error standard de la media. El N utilizado fue de 5 animales por grupo para la cepa C57BL/6J y de 7 animales por grupo para la cepa BALB/c.

### *Triglicéridos*

Las hembras EP C57BL/6J, presentan niveles menores de triglicéridos respecto de las hembras NEP ( $p < 0.001$ ). En contraposición, los machos EP BALB/c tienen niveles de triglicéridos mayores que el grupo control ( $p < 0.001$ ), figura 21.

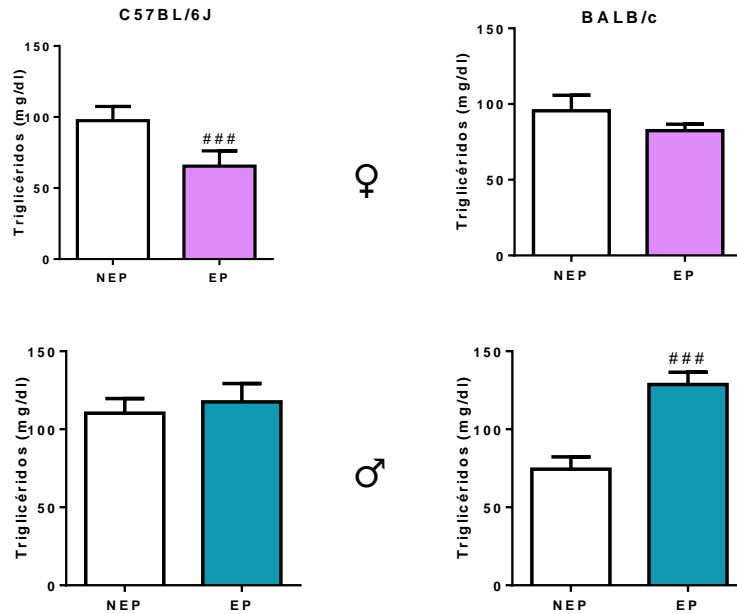
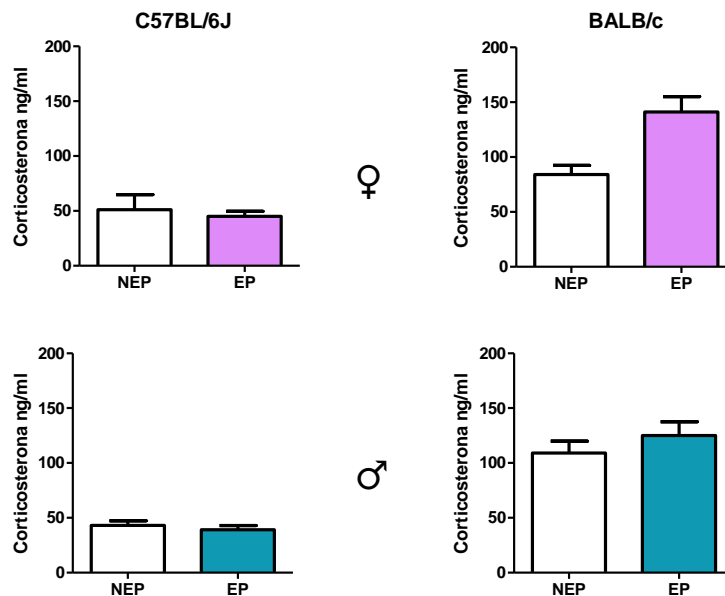


Figura 21: Niveles de triglicéridos en plasma obtenido al momento del sacrificio (28 semanas de vida). A la izquierda cepa C57BL/6J, derecha BALB/c. Panel superior hembras, inferior machos. ### $p < 0.001$  NEP vs EP. Los datos están expresados como media  $\pm$  error standard de la media. El N utilizado fue de 5 animales por grupo para la cepa C57BL/6J y de 7 animales por grupo para la cepa BALB/c.

### Corticosterona

En la figura 22 se muestran los resultados preliminares obtenidos al medir corticosterona por HPLC. No se ha podido realizar el análisis estadístico ya que la medición se realizó sobre un pool de 3 de animales por grupo.





**Figura 22: Niveles de corticosterona preliminares en plasma obtenido al momento del sacrificio (28 semanas de vida).** A la izquierda cepa C57BL/6J, derecha BALB/c. Panel superior hembras, inferior machos. Los datos están expresados como media  $\pm$  error standard de la media (10%). Se realizó un pool con 3 animales por grupo.

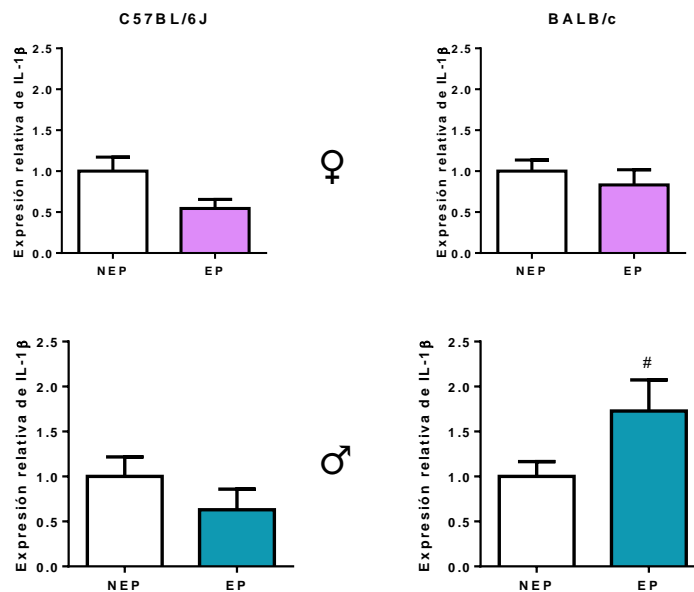
## PARTE IB: EFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL A NIVEL MOLECULAR

Evaluamos la expresión de distintos genes relacionados con la inflamación, el metabolismo energético y la acción de la insulina en los tejidos blanco de la misma: el tejido adiposo abdominal, el hígado y el músculo esquelético.

### TEJIDO ADIPOSITO

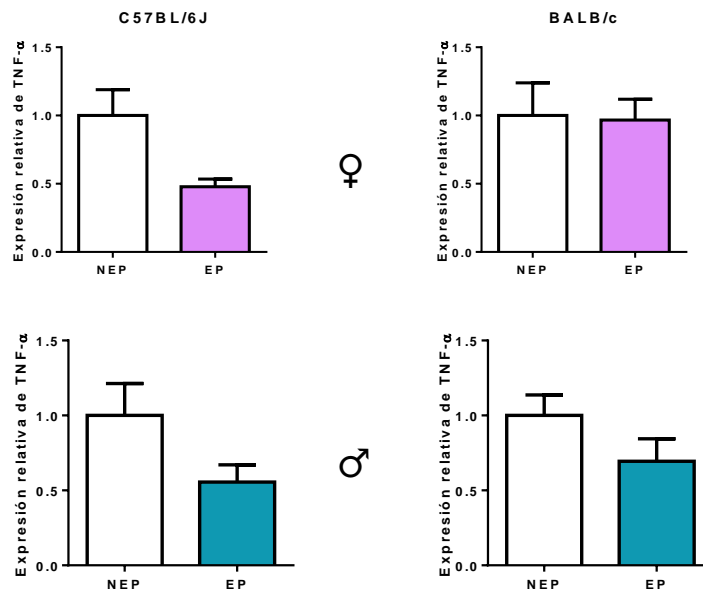
*Genes relacionados con la inflamación: IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$*

Se evaluó mediante PCR en tiempo real la expresión relativa (como nivel de RNAm) de la citoquina antiinflamatoria IL-1 $\beta$ , representada en la figura 23. Como se observa, los machos EP BALB/c tienen aumentado el nivel de RNAm de esta interleuquina.



**Figura 23: Niveles de expresión de IL-1 $\beta$ .** Mediante qPCR, a partir de DNAc obtenido del tejido adiposo de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de IL-1 $\beta$ , utilizando como gen normalizador GAPDH. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. #p<0.05 respecto NEP; N=5 para cada grupo.

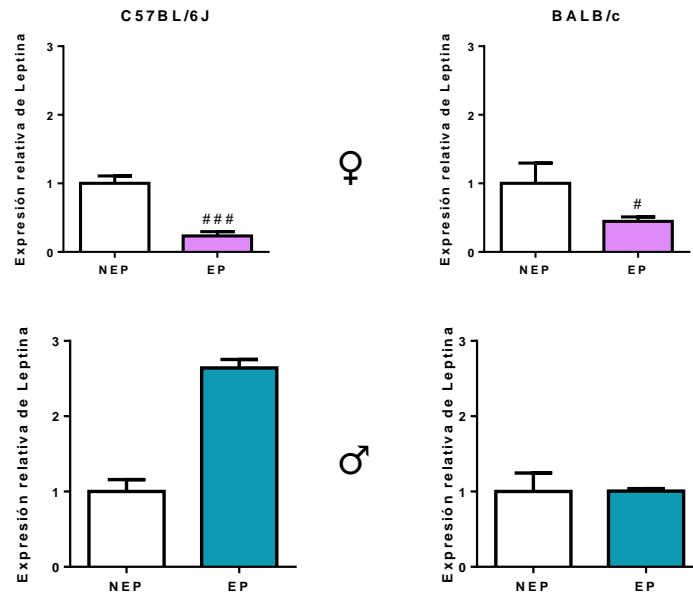
En el grafico 24 se presentan los niveles de expresión de TNF- $\alpha$ . La expresión de este gen varía dentro de la cepa C57BL/6J pero no de modo significativo, mientras que en la cepa BALB/c la expresión de este gen parece ser más estable.



**Figura 24: Niveles de expresión de TNF- $\alpha$ .** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del tejido adiposo de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de TNF- $\alpha$ , utilizando como gen normalizador GAPDH. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. N=3 para cada grupo de la cepa C57BL/6J y N=5 para cada grupo de la cepa BALB/c.

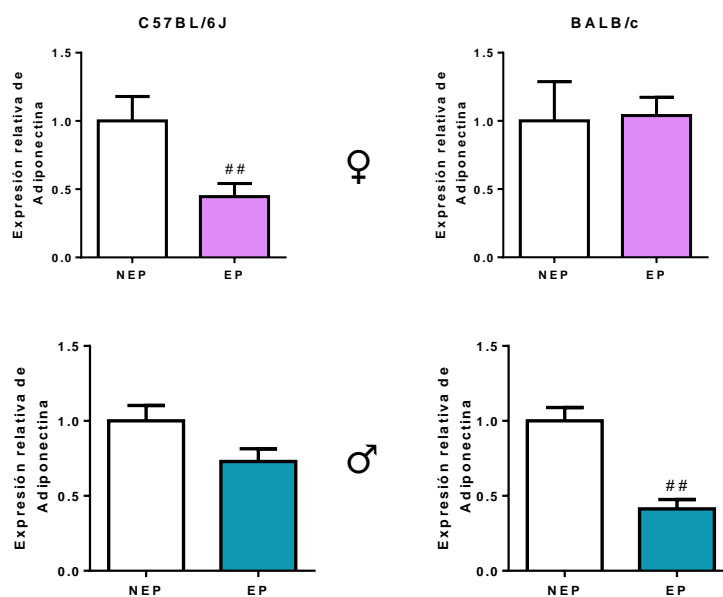
### *Adipoquinas*

Se midió la expresión de leptina, adiponectina y resistina (figuras 25, 26 y 27, respectivamente). En cuanto a leptina, se observan cambios significativos y contrapuestos en la cepa C57BL/6J al evaluar según el sexo. En el caso de las hembras EP la expresión relativa de leptina disminuye respecto del control ( $p < 0.001$ ), mientras que en los machos EP presenta una tendencia de aumento que no llega a ser significativo. En la cepa BALB/c, las hembras muestran un patrón de respuesta similar al observado para las hembras C57BL/6J, la expresión de Leptina disminuye significativamente respecto al control ( $p < 0.05$ ), figura 25.



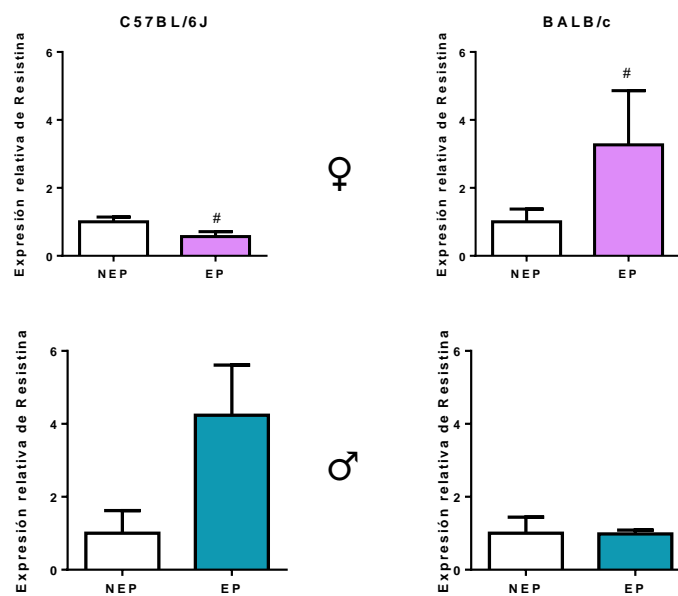
**Figura 25: Niveles de expresión de leptina.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del Tejido adiposo de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de leptina, utilizando como gen normalizador GAPDH. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. ### $p < 0.001$ , # $p < 0.05$  NEP vs EP; N=3 para cada grupo de la cepa C57BL/6J y N=5 para cada grupo de la cepa BALB/c.

Para adiponectina, se observa en la figura 26 que tanto en las hembras C57BL/6J EP como en los machos BALB/c bajo el mismo tratamiento hay una disminución de su expresión al compararla con sus respectivos controles NEP ( $p < 0.01$  para ambos casos). Tanto las hembras EP BALB/c como los machos EP C57BL/6J no presentan cambios significativos en la expresión de adiponectina.



**Figura 26: Niveles de expresión de adiponectina.** Mediante qPCR a partir de DNAC obtenido del tejido adiposo de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de adiponectina, utilizando como gen normalizador GAPDH. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. ## $p < 0.01$  NEP vs EP; N=4 para cada grupo de la cepa C57BL/6J y N=5 para cada grupo de la cepa BALB/c.

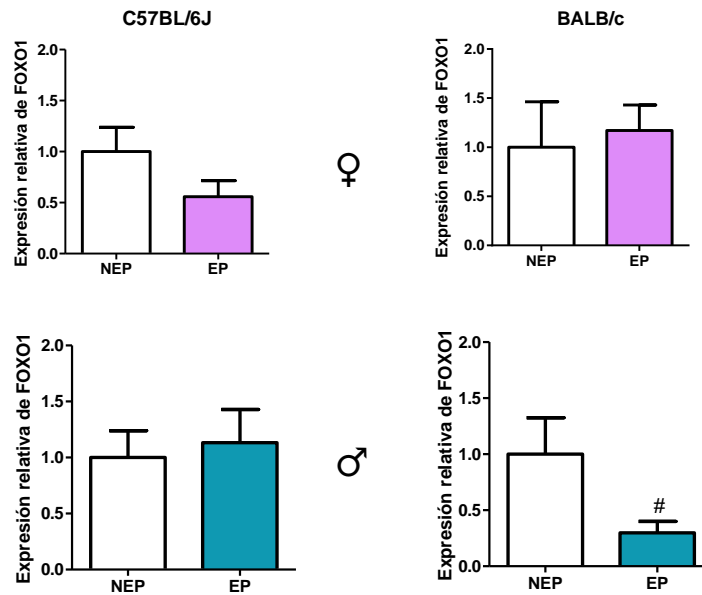
En el caso de la expresión relativa de resistina, representada en los gráficos de la figura 27, solo se observan cambios significativos y opuestos en las hembras EP de ambas cepas. Mientras que en el caso de la cepa C57BL/6J la expresión de este gen disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ), en las hembras EP BALB/c aumenta ( $p < 0.05$ ) siempre respecto del control.



**Figura 27: Niveles de expresión de resistina.** Mediante qPCR a partir de DNAC obtenido del tejido adiposo de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de resistina, utilizando como gen normalizador GAPDH. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. # $p < 0.05$  NEP vs EP; N=4 para cada grupo de la cepa C57BL/6J, N=3 para las hembras BALB/c y N=5 para los machos BALB/c.

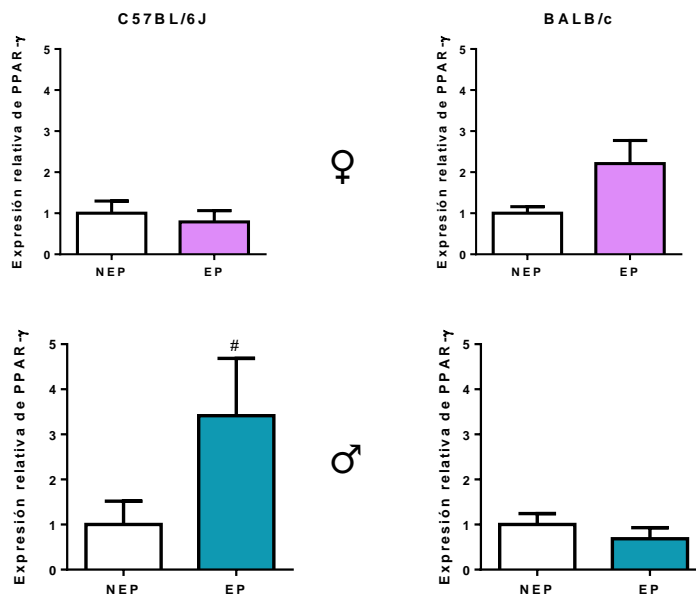
#### *Genes relacionados con el metabolismo energético: FOXO1 y PPAR- $\gamma$*

Se midieron dos genes que se encuentran involucrados en el metabolismo energético: el factor de transcripción FOXO1 y PPAR- $\gamma$ . En la figura 28, se observa que la expresión de FOXO1 en los machos EP de la cepa BALB/c disminuye respecto del control ( $p < 0.05$ ). En el caso de las hembras de ambas cepas y en los machos C57BL/6J no se registraron diferencias significativas en la expresión de este gen.



**Figura 28: Niveles de expresión de FOXO1.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del tejido adiposo de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de FOXO1, utilizando como gen normalizador GAPDH. Los resultados expresan la media ± EEM relativizado al control. #p<0.05 NEP vs EP; N=5 para cada grupo.

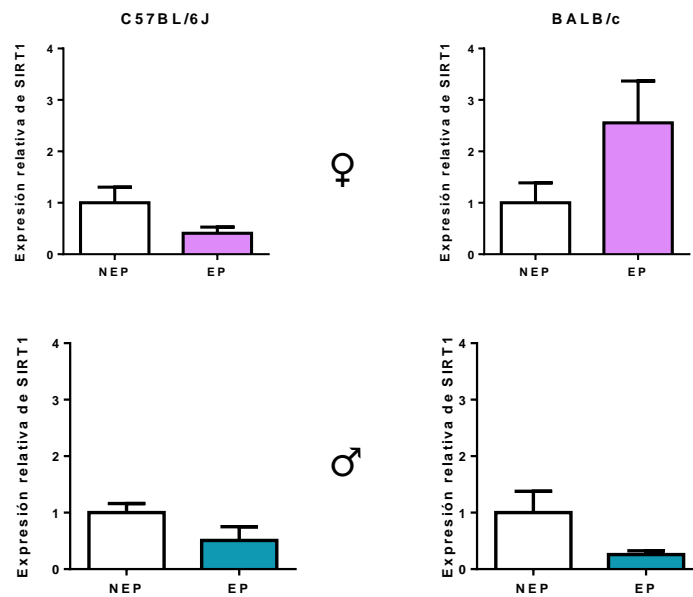
En la figura 29, se observan los niveles de expresión de PPAR- $\gamma$  que aumentan significativamente en los machos EP C57BL/6J respecto al grupo control (p<0,05). En el resto de los animales no se observaron diferencias significativas.



**Figura 29: Niveles de expresión de PPAR- $\gamma$ .** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del Tejido adiposo de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de PPAR- $\gamma$ , utilizando como gen normalizador GAPDH. Los resultados expresan la media ± EEM relativizado al control. #p<0.05 NEP vs EP; N=5 para cada grupo.

*Gen relacionado con la acción de la insulina: SIRT1*

En la figura 30, se muestran los niveles de expresión de SIRT1. No se registraron diferencias significativas en la expresión de esta desacetilasa de histona, aunque sí pueden observarse distintas tendencias bien marcadas: en donde la expresión de SIRT1 tiende a disminuir para el caso de los ratones EP de ambos sexos de la cepa C57BL/6J y los machos EP BALB/c, mientras que en las hembras EP BALB/c la tendencia es hacia un aumento.

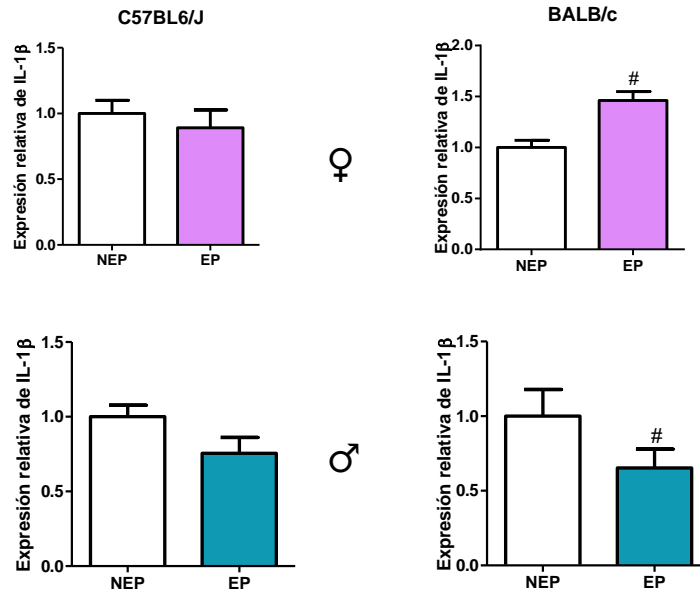


**Figura 30: Niveles de expresión de SIRT1.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del tejido adiposo de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de SIRT1, utilizando como gen normalizador GAPDH. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. N=3 para cada grupo.

## HÍGADO

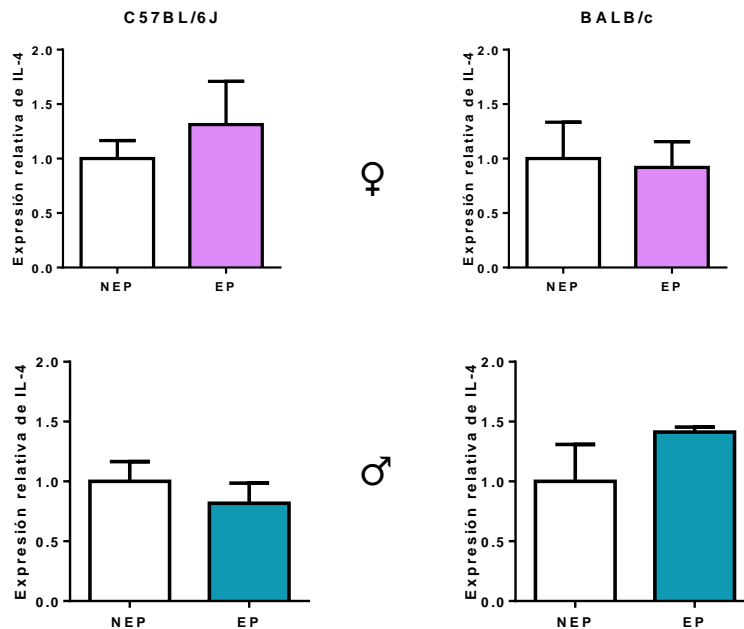
*Genes relacionados con la inflamación: IL-1 $\beta$  e IL-4*

Al medir los niveles de expresión por qPCR de IL-1 $\beta$  detectamos diferencias significativas en la cepa BALB/c. Las hembras EP tienen aumentada la expresión de esta citoquina respecto del control ( $p < 0.05$ ), mientras que en los machos, al contrario de lo que se observa en las hembras, tienen disminuida la expresión de esta citoquina ( $p < 0.05$ ). Los resultados se muestran en la figura 31.



**Figura 31: Niveles de expresión de IL-1β.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del hígado de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de IL-1β, utilizando como gen normalizador PPIA. #p<0.05 NEP vs EP. Los resultados expresan la media ± EEM relativizado al control. N=7 para cada grupo.

En la figura 32, se muestran los niveles de expresión de IL-4. En este caso en ninguna de las dos cepas se observan diferencias significativas en la expresión de esta citoquina.

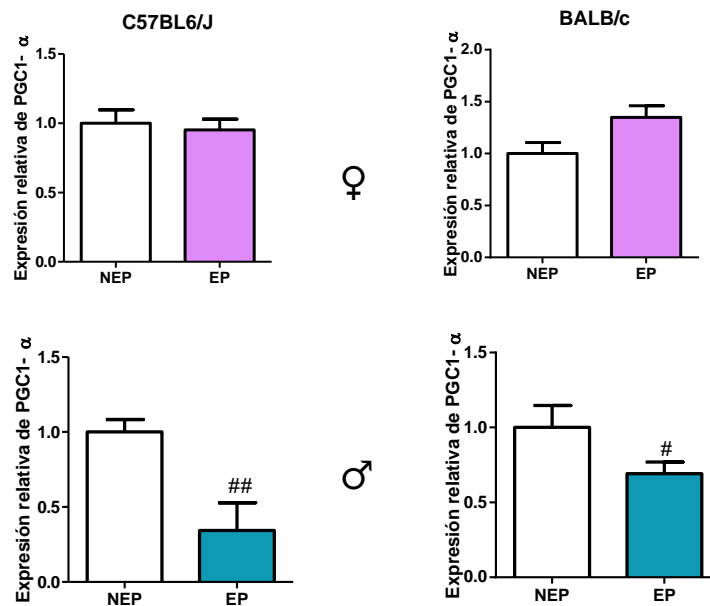


**Figura 32: Niveles de expresión de IL-4.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del hígado de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de IL-4, utilizando como gen

normalizador PPIA. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. N=5 para cada grupo de la cepa C57BL/6J y N=7 para cada grupo de la cepa BALB/c.

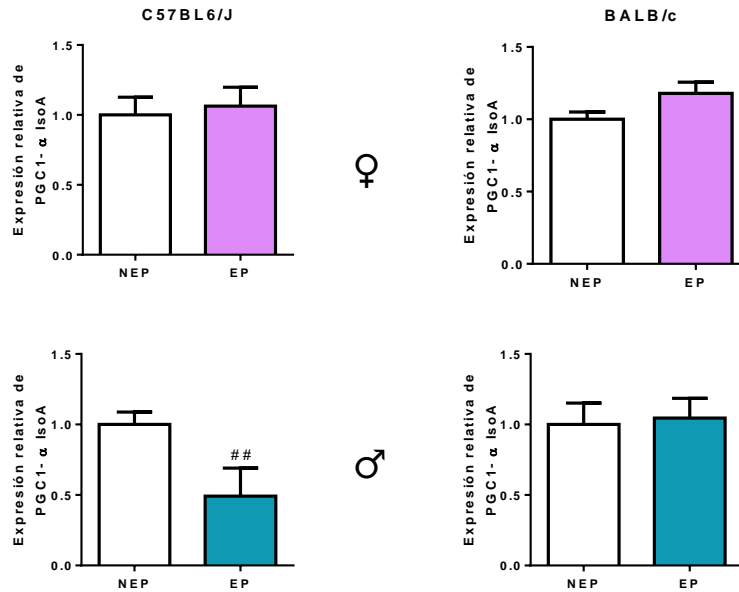
*Genes relacionados con el metabolismo energético: PGC1- $\alpha$  y PPAR- $\alpha$*

Se midió la expresión total del gen PGC1- $\alpha$  (promotor A y B), como se muestra en la figura 33 como así también la isoforma A (PGC1- $\alpha$  IsoA) en la figura 34. En el primer caso, la expresión de este gen disminuye en los machos EP de ambas cepas significativamente ( $p < 0.01$  para C57BL/6J;  $p < 0.05$  BALB/C), siempre respecto de sus respectivos controles (NEP misma cepa). En el caso de PGC1- $\alpha$  IsoA, la expresión de esta isoforma sigue la misma tendencia que la observada en la forma total, pero solamente los valores son significativos en el caso de los machos EP C57BL/6J, donde la expresión de este gen sigue siendo menor a la de su respectivo control ( $p < 0.01$ ).



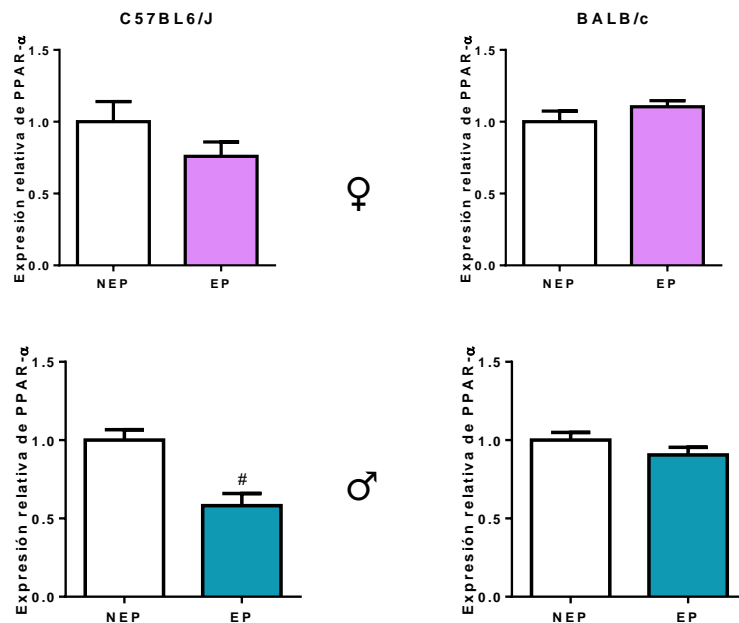
**Figura 33: Niveles de expresión de PGC1- $\alpha$ .** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del hígado de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de PGC1- $\alpha$ , utilizando como gen normalizador PPIA. <sup>##</sup> $p < 0.01$ , <sup>#</sup> $p < 0.05$  NEP vs EP. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. N=7 para cada grupo.





**Figura 34: Niveles de expresión de PGC1-α IsoA.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del hígado de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de PGC1-α, utilizando como gen normalizador PPIA. ##p<0.01 NEP vs EP. Los resultados expresan la media ± EEM. N=7 para cada grupo.

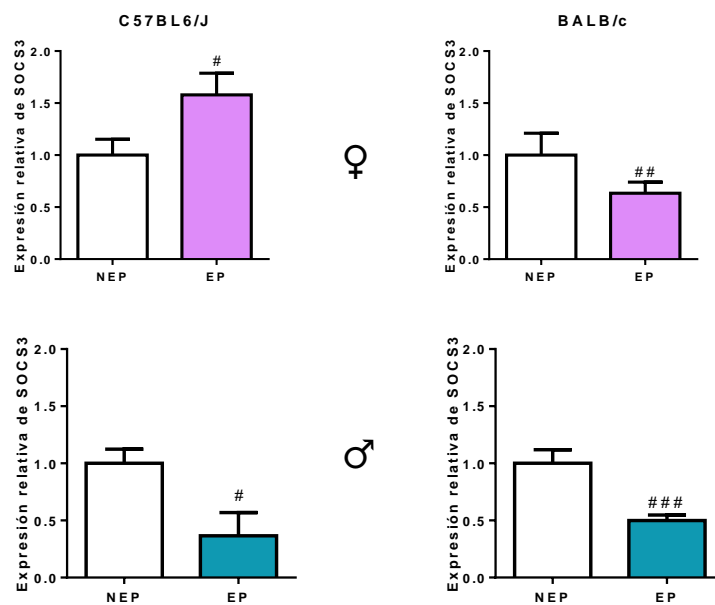
La expresión relativa de PPAR-α, medida por q-PCR en hígado, arrojó resultados significativamente distintos en los ratones macho EP C57BL/6J. Como puede observarse en los gráficos de la figura 35, estos ratones tienen disminuida la expresión de PPAR-α respecto su control (p<0.05). En los demás grupos no se observaron diferencias significativas en la expresión de este gen.



**Figura 35: Niveles de expresión de PPAR- $\alpha$ .** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del hígado de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de PPAR- $\alpha$ , utilizando como gen normalizador PPIA. # $p < 0.05$  NEP vs EP. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. N=7 para cada grupo.

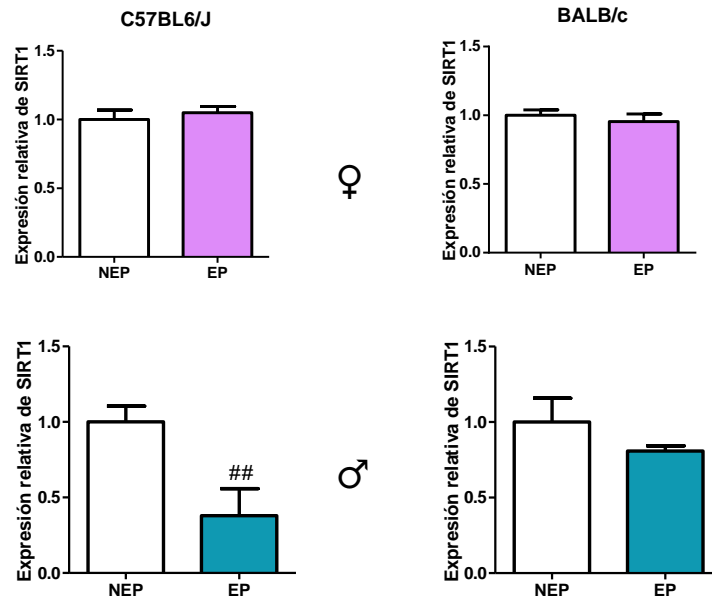
*Genes relacionados con la acción de la insulina: SOCS3, SIRT1 y SIRT3*

La expresión de SOCS3 varió significativamente en los dos sexos de ambas cepas (figura 36). Sin embargo, mientras que la expresión de este gen aumenta en las hembras EP C57BL/6J ( $p < 0.05$ ), disminuye en los machos EP de la misma cepa ( $p < 0.05$ ) y en ambos sexos de la cepa BALB/c ( $p < 0.01$  para las hembras y  $p < 0.001$  para los machos).



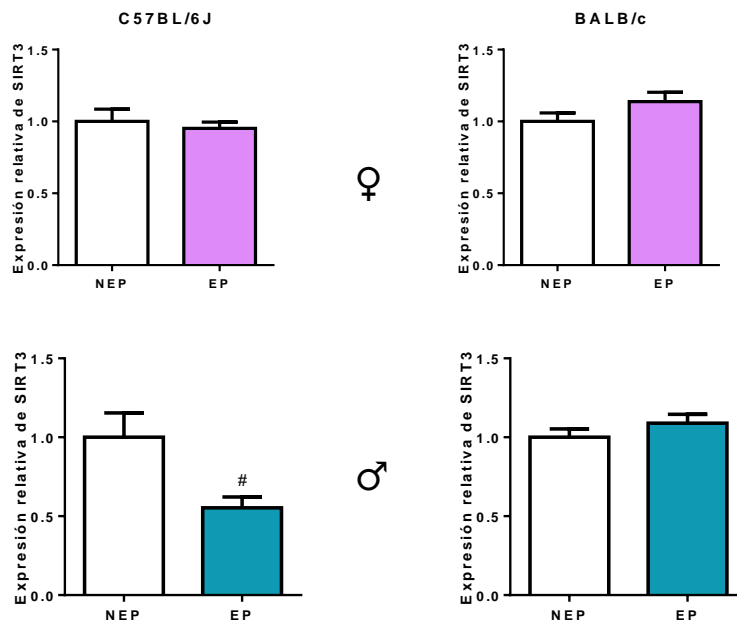
**Figura 36: Niveles de expresión de SOCS3.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del hígado de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de SOCS-3, utilizando como gen normalizador PPIA. ### $p < 0.001$ , ## $p < 0.01$ , # $p < 0.05$  NEP vs EP. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. N=7 para cada grupo.

En la figura 37 se muestra la expresión de SIRT1. Se observa que solo disminuye significativamente en los machos EP C57BL/6J ( $p < 0.01$ ), mientras que en el resto de los ratones su expresión no difiere significativamente.



**Figura 37: Niveles de expresión de SIRT1.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del hígado de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de SIRT1, utilizando como gen normalizador PPIA. ##p<0.01 NEP vs EP. Los resultados expresan la media ± ES relativizado al control. N=5 para cada grupo de la cepa C57BL/6J y N=7 para cada grupo de la cepa BALB/c.

Al evaluar la expresión de SIRT3, solo registramos una disminución significativa de la misma en los ratones macho EP de la cepa C57BL/6J. En resto de los grupos la expresión de SIRT3 no parece estar alterada por el tratamiento prenatal que recibieron los ratones, figura 38.

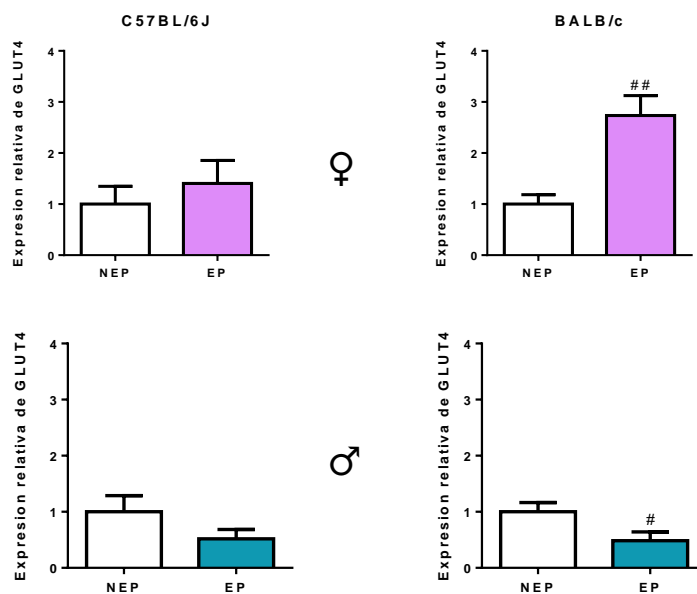


**Figura 38: Niveles de expresión de SIRT3.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del hígado de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de SIRT3, utilizando como gen normalizador PPIA. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. # $p < 0.05$  NEP vs EP; N=7 para cada grupo.

## MÚSCULO ESQUELÉTICO

### GLUT4

En el músculo esquelético de los ratones se determinó la expresión del transportador de glucosa tipo 4. Como se observa en la figura 39, solamente en los ratones de la cepa BALB/c varía significativamente la expresión de GLUT4 debido al estrés prenatal. Sin embargo, mientras que en las hembras EP aumenta la expresión de GLUT4 ( $p < 0.01$ ), en los machos EP disminuye ( $p < 0.05$ ). En la cepa C57BL/6J no se registraron variaciones significativas, pero la tendencia en la expresión de GLUT4 se corresponde a la observada en la cepa BALB/c.



**Figura 39: Niveles de expresión de GLUT4.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del músculo esquelético de los ratones EP o NEP, se determinaron los niveles de RNAm de GLUT4, utilizando como gen normalizador PPIA. ## $p < 0.01$ , # $p < 0.05$  NEP vs EP. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. N=5 para cada grupo de la cepa C57BL/6J y N=7 para cada grupo de la cepa BALB/c.

## PARTE IIA: CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE ESTRÉS PRENATAL Y EL CONSUMO DE DIETA GRASA A NIVEL FISIOLÓGICO

Con el fin de evaluar si el estrés sufrido *in útero* produce alteraciones fisiológicas y moleculares que solo se ponen en evidencia ante un desafío como es la ingesta de una DG, en la segunda parte incorporamos a los datos ya presentados el efecto de la ingesta de una DG.

### *Peso corporal desde la 4<sup>ta</sup> hasta la 28<sup>va</sup> semana de vida.*

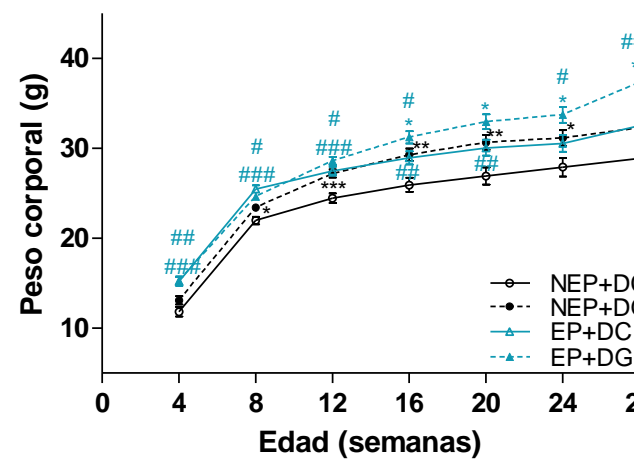
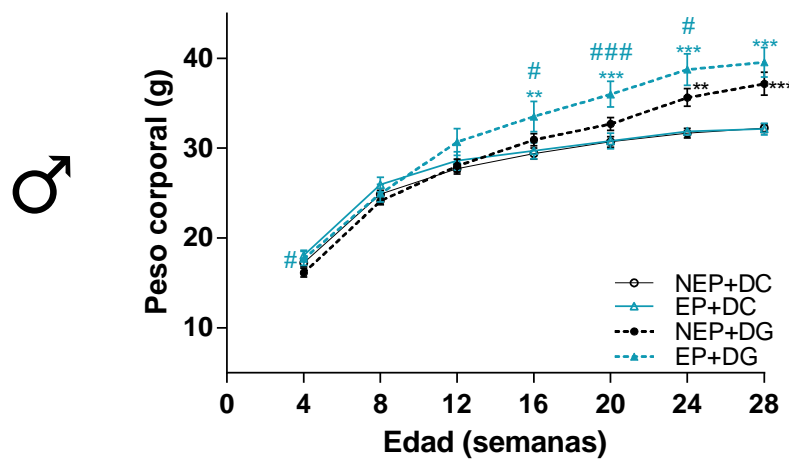
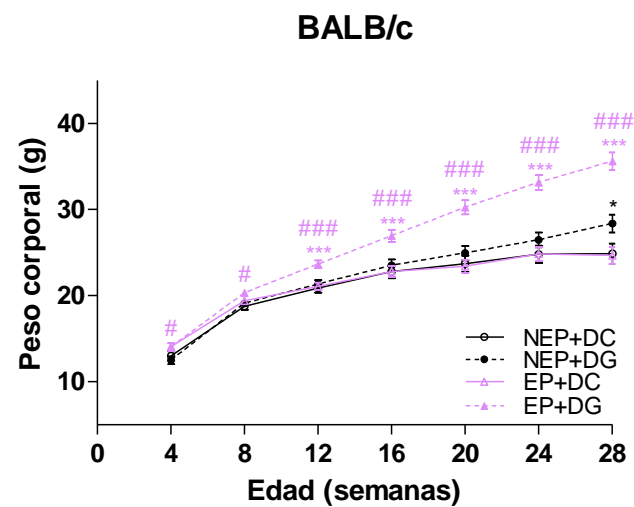
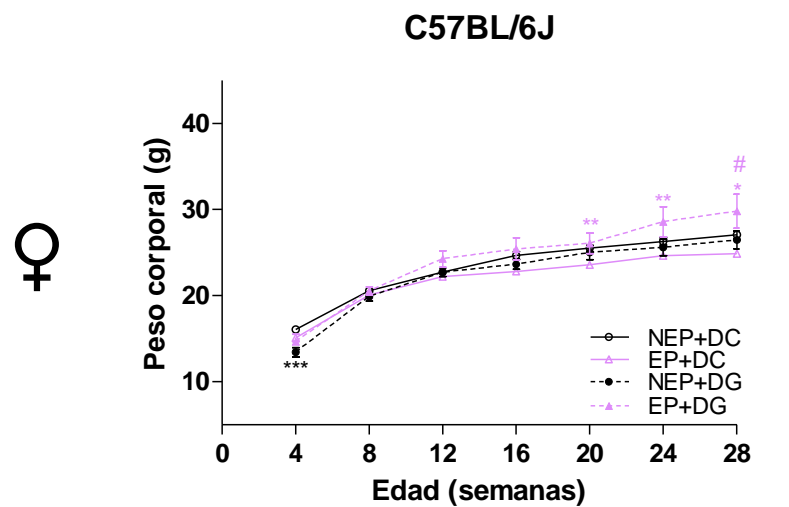
Los animales NEP y EP de ambas cepas fueron divididos en dos grupos y desde la semana 4 de vida fueron alimentados con distintas dietas: un grupo recibió una DC y el otro una DG. Desde ese momento y hasta las 28 semanas de edad se registró semanalmente el peso corporal, como se muestra en la figura 40. Puede observarse que las hembras de la cepa C57BL/6J cuando consumieron una DG, a partir de la semana 20 hasta la 28 presentaron un aumento significativo del peso en el grupo EP+DG cuando se las compara con el grupo EP y alimentado con una DC (EP:  $p < 0.01$  DC vs DG).

Los machos de la cepa C57BL/6J no mostraron diferencias en el peso debidas al tratamiento prenatal cuando consumieron una DC. Al incorporar la DG se observa que los machos NEP+DG de esta cepa mostraron diferencias significativas en el peso a partir de la semana 24 al compararlos con el grupo que recibió la DC y no fue estresado prenatalmente (NEP:  $p < 0.01$  DC vs DG). Lo mismo sucede con los machos EP+DG al compararlos con aquellos que recibieron el mismo tratamiento prenatal pero que consumieron una dieta control, a partir de la semana 16 el peso entre ellos difiere significativamente (EP:  $p < 0.01$  DC vs DG). Finalmente, evaluando dentro del grupo de animales que consumió una DG, los machos EP presentan un mayor peso corporal a partir de la semana 16 al compararlos con aquellos que no fueron estresados prenatalmente (DG:  $p < 0.05$  NEP vs EP).

Analizando las hembras de la cepa BALB/c, como ya habíamos mencionado, no presentaron alteraciones en el peso corporal debidas al estrés prenatal *per se* durante todo el experimento. Cuando los animales fueron alimentados con una DG, las hembras NEP+DG presentaron un leve aumento del peso corporal respecto a las hembras NEP+DC que es significativo únicamente en la semana 28 (NEP:  $p < 0.05$  DC vs DG). Mientras que las EP+DG presentan un mayor peso corporal que las EP+DC desde las 12 semanas de vida (8 semanas de dieta, EP:  $p < 0.001$  DC vs DG). Además, la ingesta de la DG desde el principio produjo un

notorio incremento en el peso corporal de las EP respecto de las NEP (DG:  $p < 0.05$  NEP vs EP).

En el caso de los machos BALB/c ya habíamos mencionado que el EP *per se* produjo un aumento sostenido del peso corporal durante las 28 semanas que duró el experimento. Al incorporar la ingesta de la DG, los machos NEP+DG aumentaron significativamente de peso a partir de la semana 8 al compararlos con aquellos que tampoco fueron estresados pero que consumieron una DC (NEP:  $p < 0.01$  DC vs DG). Lo mismo ocurre con el grupo EP+DG al compararlo con los machos EP+DC, a partir de la semana 16 (EP:  $p < 0.05$  DC vs DG). Por último, al comparar el peso entre los machos NEP vs EP que consumieron una DG, se observa que los machos EP desde la semana 4 presentan un mayor peso corporal respecto los machos NEP (DG:  $p < 0.01$  NEP vs EP).

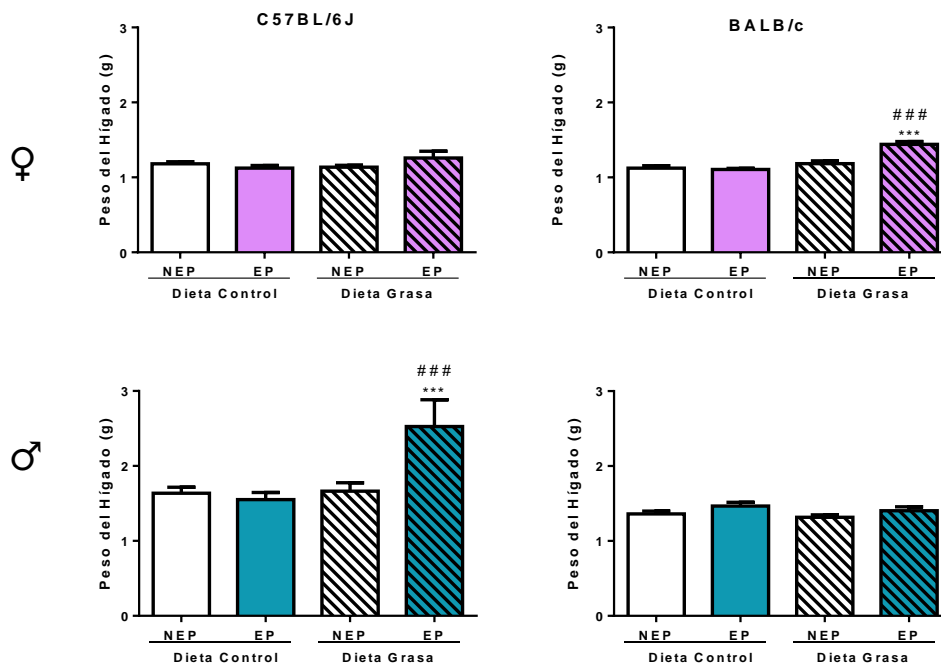


**Figura 40: Peso corporal de los ratones C57BL/6J y BALB/C desde las 4 hasta las 28 semanas de edad alimentados con una dieta grasa.** Izquierda: cepa C57BL/6J, Derecha: cepa BALB/C; Arriba: hembras; Abajo: machos. ###p < 0.001, ##p < 0.01, #p < 0.05 NEP vs EP entre ratones alimentados con igual dieta. \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05 DC vs DG entre ratones con el mismo tratamiento prenatal. Los animales utilizados por grupo fueron N=5 para la cepa C57BL/6J y N=8 para la cepa BALB/C. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. NEP: no estresado prenatalmente; EP: estresado prenatalmente; DC: dieta control; DG: dieta grasa.



### Peso bruto y relativo del hígado

En la figura 41 se presenta el peso del hígado (peso bruto del tejido), se observa que tanto los machos EP C57BL/6J como las hembras EP BALB/c presentan un mayor peso de este órgano respecto del control NEP que consumió la misma DG ( $p < 0.001$ ) y, también cuando se los compara con los animales EP que consumieron una DC ( $p < 0.001$ ).

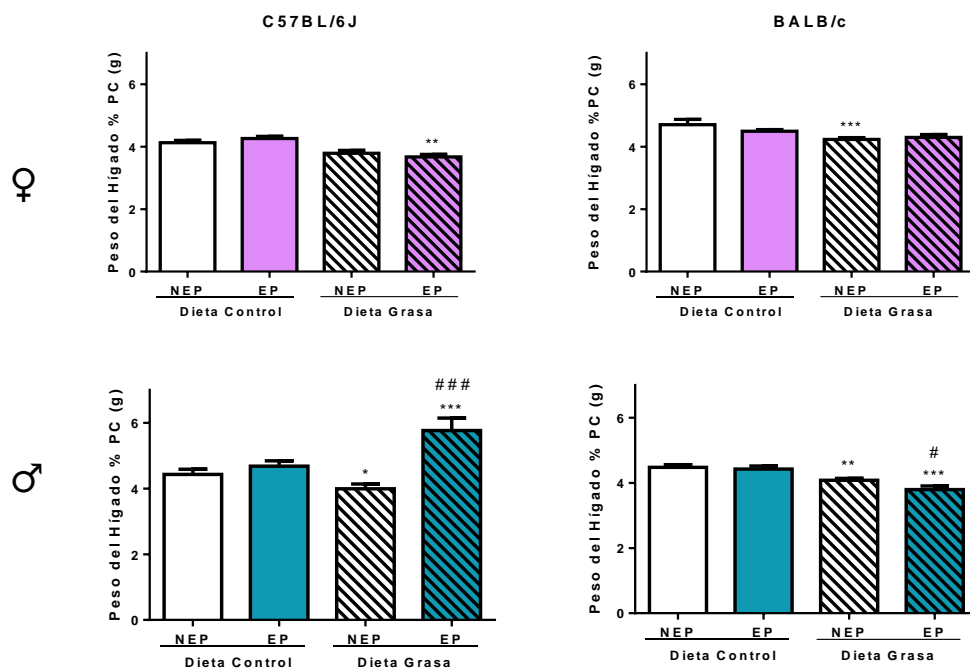


**Figura 41: Peso del hígado.** A la izquierda cepa C57BL6/J, derecha BALB/c. Panel superior hembras, inferior machos. \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  DC vs DG para ratones con el mismo tratamiento prenatal. ### $p < 0.001$ , # $p < 0.05$  NEP vs EP para ratones que recibieron la misma dieta. Los datos están expresados como media  $\pm$  error standard. El N utilizado fue de 6 animales por grupo para la cepa C57BL/6J y de 8 para los BALB/c.

La figura 42 muestra el peso relativo del hígado. En la cepa C57BL/6J a diferencia de lo que se observó cuando los animales consumieron una DC, cuando consumen una DG el peso de este órgano varía de manera significativa. Analizando las hembras EP+DG se observa que el peso del hígado es menor respecto del grupo EP pero que consumió una DG (EP:  $p < 0.01$  DC vs DG). Cuando se evalúa a los machos de esta cepa, se observa que el grupo NEP+DG tiene un peso relativo del hígado menor que el grupo NEP+DC (NEP:  $p < 0.05$  DC vs DG). En el caso del grupo de machos EP+DG, al contrario de lo que sucede cuando los animales no fueron estresados prenatalmente, el peso relativo de este órgano resulta mayor cuando se lo compara con el grupo que recibió el mismo tratamiento prenatal pero que consumió una DC (EP:  $p < 0.001$

DC vs DG). Finalmente, evaluando dentro del grupo de machos que consumió una DG, los machos EP presentan un mayor peso relativo del hígado respecto del grupo control NEP (DG:  $p < 0.001$  NEP vs EP).

Al evaluar la cepa BALB/c recordemos que cuando los animales consumieron una DC no se observaron cambios debidos al tratamiento prenatal *per se*, pero al introducir la DG se registran diferencias significativas. En el grupo NEP+DG, tanto las hembras como los machos, presentan un menor peso relativo del hígado al compararlos con el grupo que recibió el mismo tratamiento prenatal pero que consumió una DC (NEP:  $p < 0.001$  hembras y  $p < 0.01$  machos, DC vs DG). Los machos EP presentaron un peso relativo del hígado significativamente distinto cuando se los compara con el grupo EP+DC (EP:  $p < 0.001$  DC vs DG). Finalmente, evaluando dentro del grupo de machos que consumió una DG, los machos EP presentan menor peso relativo del hígado respecto a los controles (DG:  $p < 0.05$  NEP vs EP).

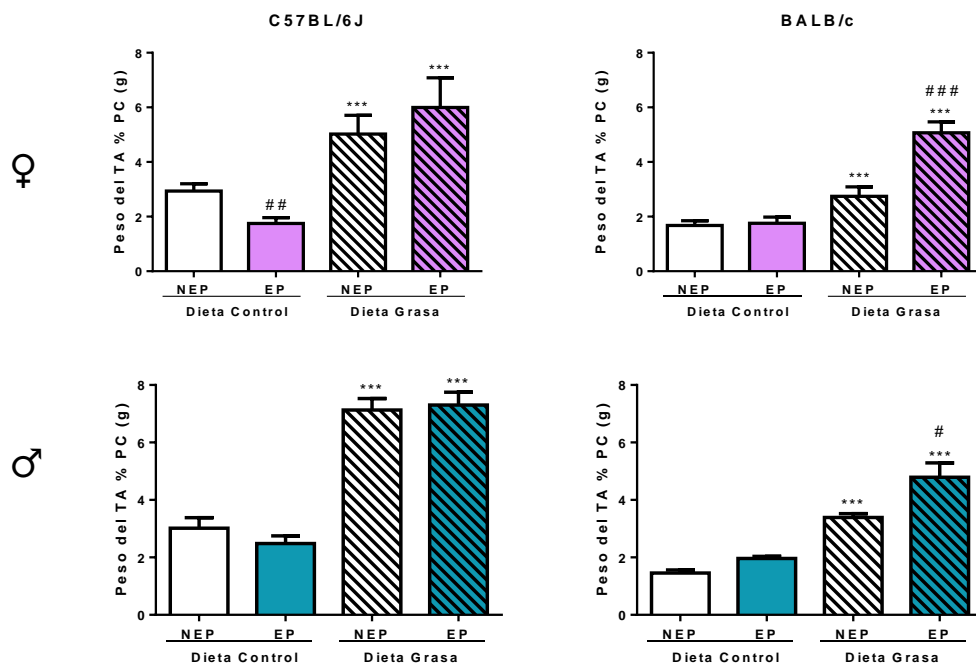


**Figura 42: Peso relativo del hígado.** Expresado como la relación entre el peso del órgano y el peso corporal multiplicada por 100. A la izquierda cepa C57BL6/J, derecha BALB/c. Panel superior hembras, inferior machos. \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  DC vs DG para ratones con el mismo tratamiento prenatal. ### $p < 0.001$ , # $p < 0.05$  NEP vs EP para ratones que recibieron la misma dieta. Los datos están expresados como media  $\pm$  error standard. El N utilizado fue de 6 animales por grupo para la cepa C57BL/6J y de 8 para los BALB/c.

**Peso relativo del Tejido Adiposo abdominal**

Como ya habíamos observado las hembras EP+DC C57BL/6J tenían un menor peso del tejido adiposo que su control. En la figura 43, cuando los animales consumen una DG se observa que las hembras de esta cepa, independientemente del tratamiento prenatal recibido, presentan un peso relativo del tejido adiposo mayor al de los animales que consumieron una DC (NEP:  $p < 0.001$  DC vs DG; EP:  $p < 0.001$  DC vs DG). Lo mismo ocurre cuando los machos C57BL/6J consumen una DG, en ambos casos independientemente del tratamiento prenatal recibido presentan un peso relativo del tejido adiposo mayor que el grupo que consumió una DC (NEP:  $p < 0.001$  DC vs DG; EP:  $p < 0.001$  DC vs DG).

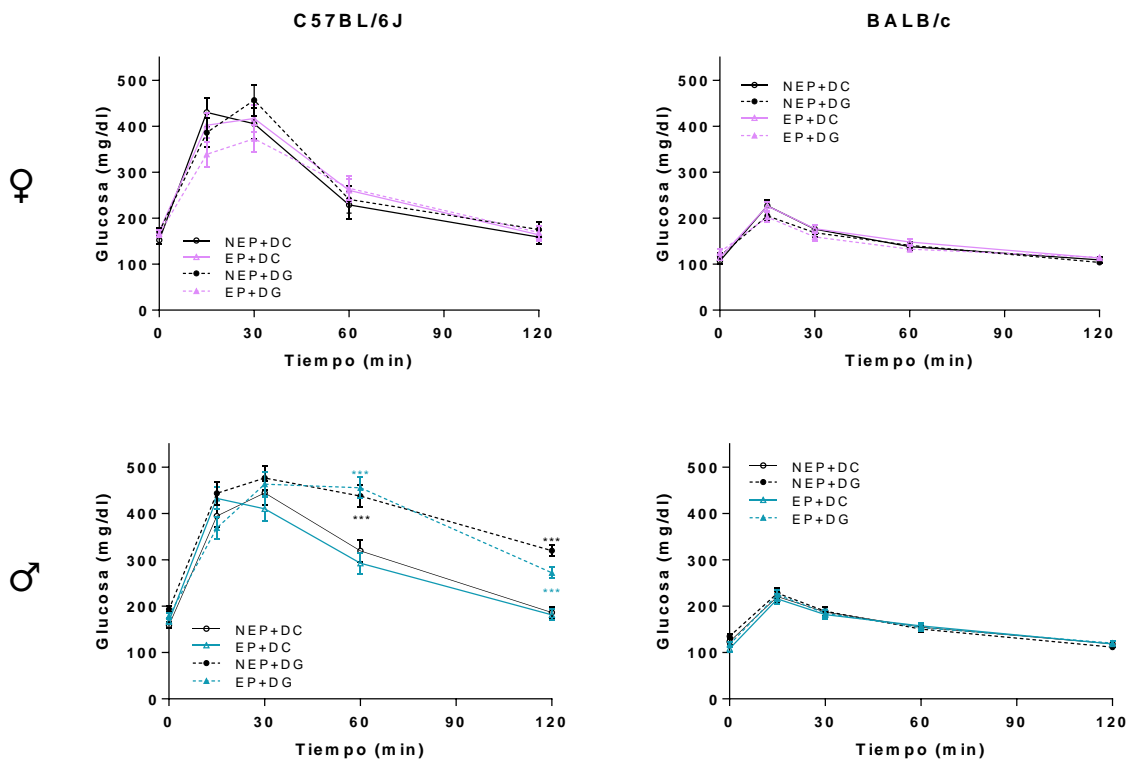
Evaluando la cepa BALB/c se observa, al igual de lo que se observó en la otra cepa que, el peso del tejido adiposo de los ratones que consumieron una DG es mayor al de aquellos alimentados con una DC independientemente el tratamiento prenatal recibido (NEP:  $p < 0.001$  DC vs DG; EP:  $p < 0.001$  DC vs DG tanto para hembras y machos). Por último, en ambos sexos de la cepa BALB/c aparecen diferencias en los ratones EP cuando consumen una DG, que no se observaron cuando recibieron el mismo tratamiento prenatal pero una DC. Los ratones EP+DG tiene un mayor peso relativo del tejido adiposo al compararlo con el grupo control (DG:  $p < 0.001$  NEP vs EP hembras; DG:  $p < 0.05$  NEP vs EP machos).



**Figura 43: Peso relativo del tejido adiposo.** Expresado como la relación entre el peso del tejido adiposo y el peso corporal multiplicada por 100. A la izquierda C57BL/6J, derecha BALB/c. Panel superior cepa hembras, inferior machos. \*\*\* $p < 0.001$  DC vs DG mismo tratamiento prenatal. ### $p < 0.001$ , ## $p < 0.01$ , # $p < 0.05$  NEP vs EP misma dieta. Los datos están expresados como media  $\pm$  error standard de la media. El N utilizado fue de 6 animales por grupo para la cepa C57BL/6J y de 8 para los BALB/c.

**Curva de tolerancia a la glucosa**

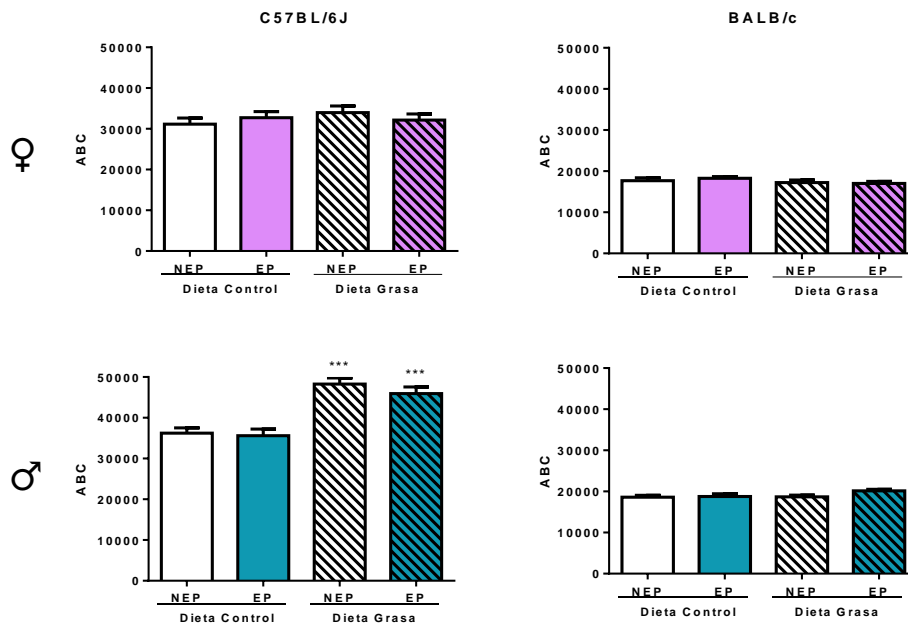
A las 24 semanas de edad realizamos el test de tolerancia a la glucosa, en el gráfico 44 pueden observarse las curvas de glucemia para los distintos tiempos registrados. Solamente los machos que consumieron una DG de la cepa C57BL/6J presentaron una curva de tolerancia a la glucosa alterada, con glucemias significativamente mayores a las del grupo que consumió una DC, independientemente del tratamiento prenatal recibido ( $p < 0.001$  DC vs DG). Tanto en la cepa BALB/c como en las hembras C57BL/6J la alimentación con una DG no produjo ningún tipo de cambio en los resultados de este test.



**Figura 44: Curva de tolerancia a la glucosa a las 24 semanas de vida.** Los ratones fueron ayunados durante 6 horas en el período de luz y luego se les inyectó intraperitonealmente una dosis de 2g/kg de D-glucosa disuelta en buffer fosfato estéril. Se observan las glucemias a los 15, 30, 60 y 120 minutos post inyección de glucosa. A la izquierda cepa C57BL/6J, derecha BALB/C, panel superior hembras, inferior machos. \*\*\* $p < 0.001$  para los animales que consumieron una DG respecto de los que consumieron una DC, independientemente del tratamiento prenatal

recibido. El N utilizado por grupo fue de 5 animales para la cepa C57BL/6J y 8 para la cepa BALB/C. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.

En la figura 45 se muestran los gráficos que representan el área bajo la curva de este ensayo. Al igual que en la figura 44, los machos de la cepa C57BL/6J que consumieron una DG, presentan glucemias significativamente mayores que aquellos que consumieron una DC ( $p < 0.001$  DC vs DG).



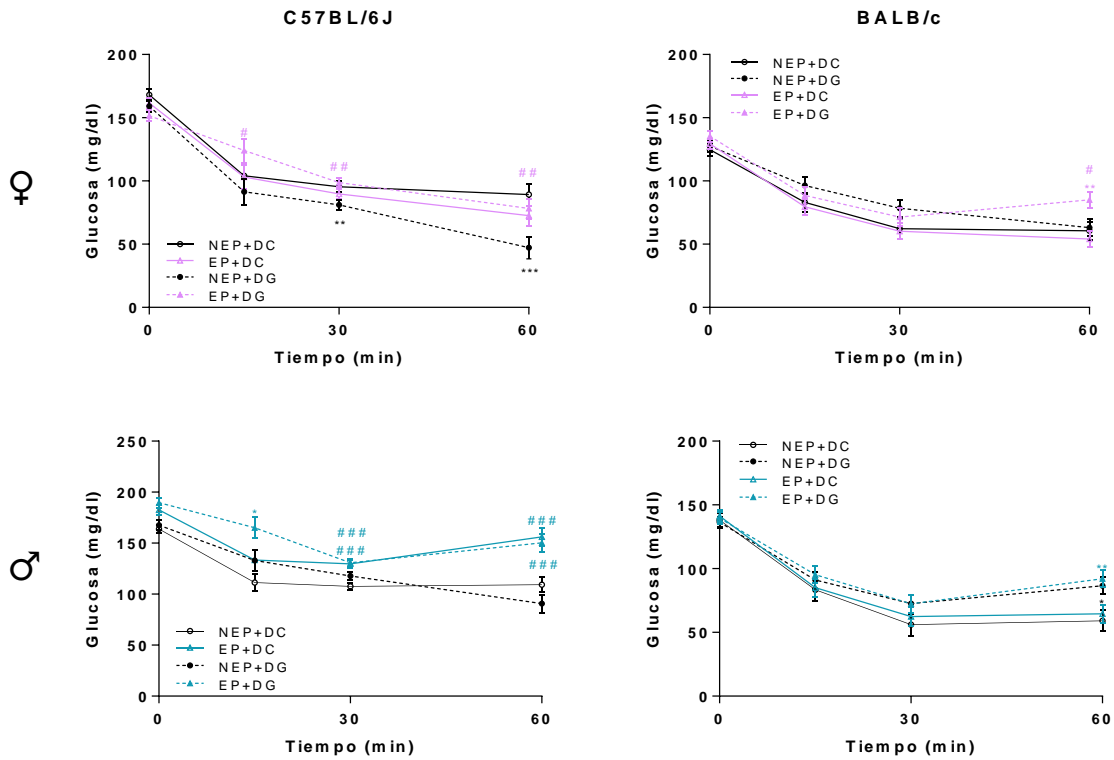
**Figura 45: Área bajo la curva del test de tolerancia a la glucosa.** Se representa el área bajo la curva (ABC) correspondiente a las curvas de glucemia al realizar el ensayo de tolerancia a la glucosa y registrar las glucemias a distintos tiempos. NEP: no estresado prenatalmente; EP: estresado prenatalmente. A la izquierda cepa C57BL/6J, derecha BALB/c, panel superior hembras, inferior machos. \*\*\* $p < 0.001$  DG vs DC entre ratones que recibieron el mismo tratamiento prenatal. Los animales utilizados por grupo fueron N=5 para la cepa C57 y N=8 para la cepa BALB/C. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.

### *Test de sensibilidad a la insulina*

Cuando los ratones cumplieron 25 semanas de vida se realizó el test de sensibilidad a la insulina. A los animales no ayunados se les inyectó intraperitonealmente insulina (1UI/kg) y se registró la glucemia a distintos tiempos. Los resultados están representados en la figura 46. Comenzando con la cepa C57BL/6J, recordemos que no se observaron diferencias significativas entre los animales cuando consumieron una DC, al incorporar la DG las hembras NEP a los 30 y 60 minutos post-inyección de insulina presentaron glucemias significativamente menores que el grupo NEP+DC (NEP:  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$  DC

vs DG, respectivamente). Finalmente, las hembras EP+DG presentan una menor sensibilidad a la insulina dado que su glucemia no desciende del mismo modo que en las no NEP+DG post-inyección a los 15, 30 y 60 minutos (DG:  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.01$  DC vs DG, respectivamente). En el caso de los machos C57BL/6J, previamente se había observado que los machos NEP+DC presentaban glucemias mayores respecto del grupo control y, cuando los animales consumen una DG, se observa el mismo comportamiento: los machos EP+DG alcanzan glucemias significativamente mayores al compararlas con el grupo que recibió la misma dieta pero que no fue sometido a estrés prenatal (DG:  $p < 0.001$  NEP vs EP).

Analizando la cepa BALB/C, por primera vez encontramos glucemias significativamente distintas cuando los animales consumen una DG. Por ejemplo, se observa que las hembras EP+DG a los 60 minutos tuvieron una glucemia mayor que el grupo EP+DC (EP:  $p < 0.01$  NEP vs EP); además, evaluando dentro del grupo de hembras que consumió una DG, ocurre lo mismo y en el mismo tiempo: las hembras EP+DG alcanzan una glucemia mayor respecto el grupo NEP+DG (DG:  $p < 0.05$  NEP vs EP). Los machos BALB/c que consumieron una DG, independientemente del tratamiento prenatal, a los 60 minutos presentan valores de glucemia mayores que aquellos alimentados con una DC (NEP:  $p < 0.01$  DC vs DG y EP:  $p < 0.05$  DC vs DG).

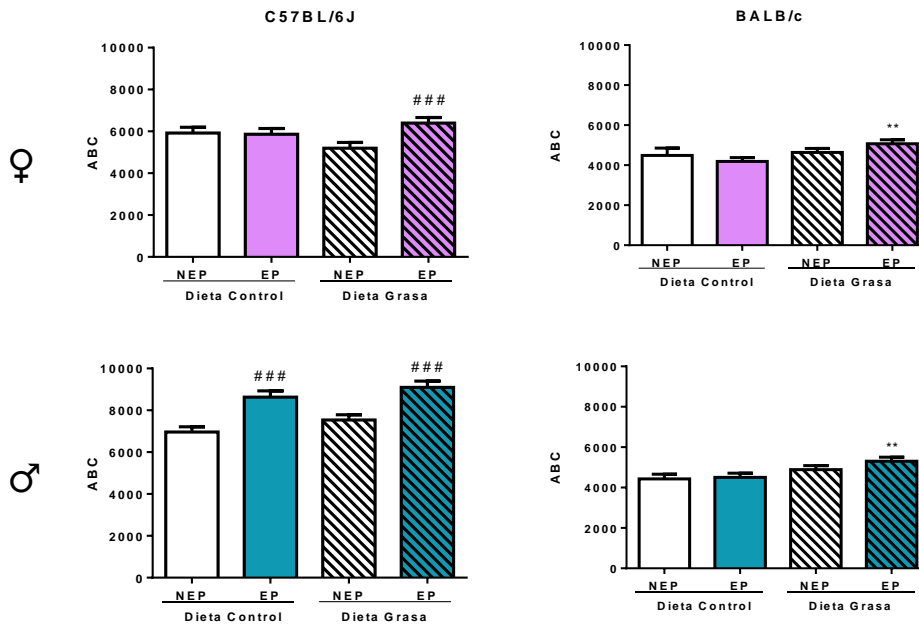


**Figura 46: Test de sensibilidad a la insulina.** Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de insulina humana de corta duración (1 UI/kg) disuelta en buffer fosfato estéril. Se observan las glucemias a los 15, 30 y 60 minutos post-inyección de insulina. A la izquierda cepa C57BL/6J, derecha BALB/C, panel superior hembras, inferior machos. ###p<0.001, ##p<0.01 NEP vs EP entre los ratones que consumieron la misma dieta; \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05 DC vs DG entre los ratones que recibieron el mismo tratamiento prenatal. Cepa C57BL/6J N=5 para cada grupo y BALB/c N=8 para cada grupo. Los resultados se expresan como la media ± EEM.

En este caso también evaluamos el área bajo la curva del test de sensibilidad a la insulina: figura 47. Las hembras de la cepa C57BL/6J, cuando los animales consumen una DG, se observa que las hembras EP presentan un área bajo la curva mayor respecto de las que no fueron estresadas e ingirieron la misma dieta (DG: p<0.001 NEP vs EP); mientras que los machos que ingirieron una DG mantienen el mismo comportamiento observado anteriormente, cuando los animales consumieron una DC: los machos EP tienen un área bajo la curva mayor que aquellos que no fueron estresados prenatalmente (DG: p<0.001 NEP vs EP).

Evaluando la cepa BALB/c se observa que, en ambos sexos, el consumo de una DG produjo cambios que no se habían observado anteriormente cuando los animales consumieron una DC. Los ratones EP, independientemente del sexo,

tienen mayor área bajo la curva que su respectivo grupo control (DG:  $p < 0.01$  NEP vs EP).



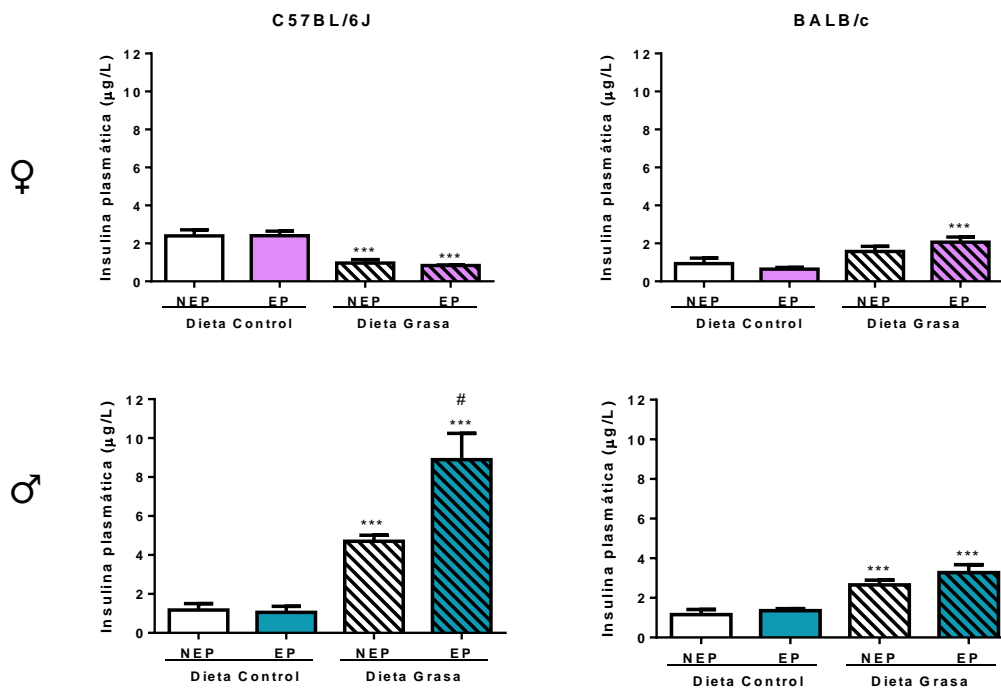
**Figura 47: Área bajo la curva del test de sensibilidad a la insulina.** Se representa el área bajo la curva (ABC) correspondiente a las curvas de glucemia al realizar el test de sensibilidad a la insulina y registrar las glucemias a distintos tiempos. A la izquierda cepa C57BL/6J, derecha BALB/C, panel superior hembras, inferior machos. ### $p < 0.001$  NEP vs EP en una misma dieta; \*\* $p < 0.01$  DC vs DG en animales con mismo tratamiento prenatal. Los animales utilizados por grupo fueron N=5 para la cepa C57BL/6J y N=8 para la cepa BALB/c. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM.

### *Insulina plasmática*

Como se puede observar en la figura 48, existen diferencias significativas en los niveles de insulina plasmática cuando los animales son alimentados con una DG. Llamativamente, en las hembras C57BL/6J observamos que la ingesta de este tipo de dieta produjo una disminución de los niveles de insulina, independientemente del tratamiento prenatal realizado (NEP:  $p < 0.001$  DC vs DG; EP:  $p < 0.001$  DC vs DG). Los machos de la misma cepa presentaron un aumento de los niveles de insulina cuando se compara entre los animales que recibieron el mismo tratamiento prenatal pero que consumieron una dieta distinta (NEP:  $p < 0.001$  DC vs DG; EP:  $p < 0.001$  DC vs DG), además el grupo de machos EP que consumió una DG alcanzó niveles de insulina plasmática aún mayores que su control (DG:  $p < 0.05$  NEP vs EP).



Evaluando la cepa BALB/c, solamente las hembras EP+DG presentaron un aumento significativo de los niveles de insulina circulante (EP:  $p < 0.001$  DC vs DG). Los machos de esta cepa presentaron un incremento en los niveles de insulina que se encontró relacionado únicamente con la ingesta de la dieta, ya que el tratamiento prenatal no mostró alteración alguna en este parámetro (NEP:  $p < 0.001$  DC vs DG; EP:  $p < 0.001$  DC vs DG).

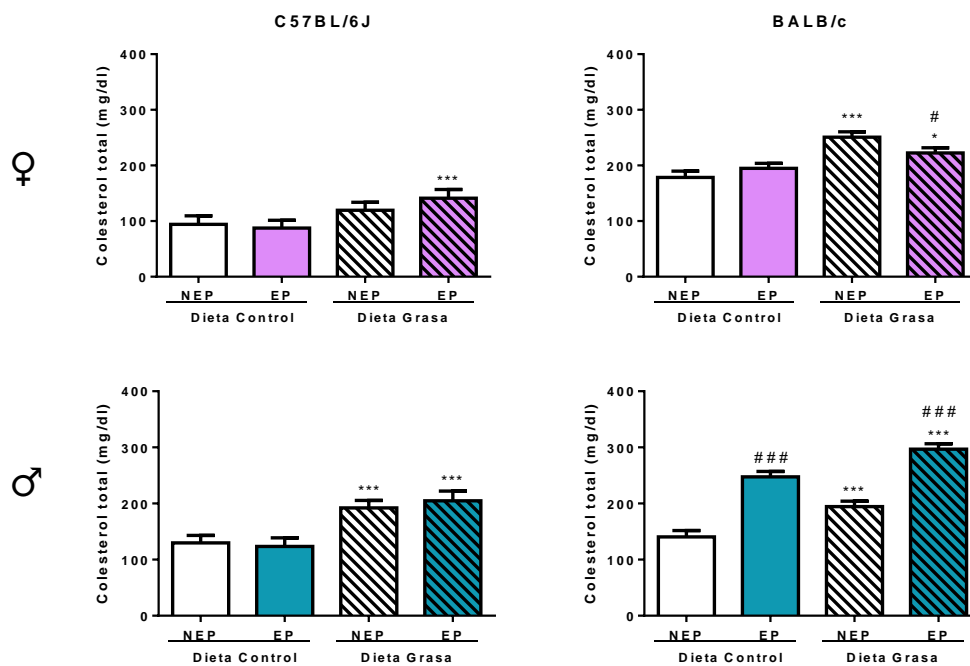


**Figura 48: Concentración de insulina en plasma.** Se determinó, por ELISA, la insulina plasmática de los ratones de 28 semanas de edad no ayunados. A la izquierda cepa C57BL6/J, derecha BALB/c. Panel superior hembras, inferior machos. \*\*\* $p < 0.001$  DC vs DG manteniendo el mismo tratamiento prenatal. # $p < 0.05$  NEP vs EP dentro de una misma dieta. Los datos están expresados como media  $\pm$  error standard de la media. El N utilizado fue de 4 animales por grupo para cada cepa.

### *Colesterol total*

Se midió el colesterol total en plasma, a las 28 semanas de edad, y los resultados se observan en la figura 49. En la cepa C57BL/6J los niveles de colesterol de los machos se encontraron aumentados cuando el animal consumió una DG, independientemente del tratamiento prenatal recibido (NEP:  $p < 0.001$  DC vs DG; EP:  $p < 0.001$  DC vs DG); en las hembras de la misma cepa se observó el mismo comportamiento, pero sólo en el grupo EP+DG (EP:  $p < 0.001$  DC vs DG). Tanto las hembras como los machos BALB/c que consumieron una DG presentaron mayores niveles de colesterol que los grupos alimentados con una

DC, independientemente del tratamiento prenatal recibido (NEP:  $p < 0.001$  y EP:  $p < 0.05$  DC vs DG para las hembras; NEP:  $p < 0.001$  y EP:  $p < 0.001$  DC vs DG para los machos). Un resultado llamativo es que las hembras EP+DG tienen menores niveles de colesterol que aquellas que no fueron estresadas prenatalmente e ingirieron la misma dieta (DG:  $p < 0.05$  NEP vs EP). Contrariamente, los machos EP+DG, al igual que lo observado previamente en el grupo que consumió una DC, presentan mayores niveles de colesterol al compararlos con el grupo NEP que consumió una DG (DG:  $p < 0.001$  NEP vs EP).

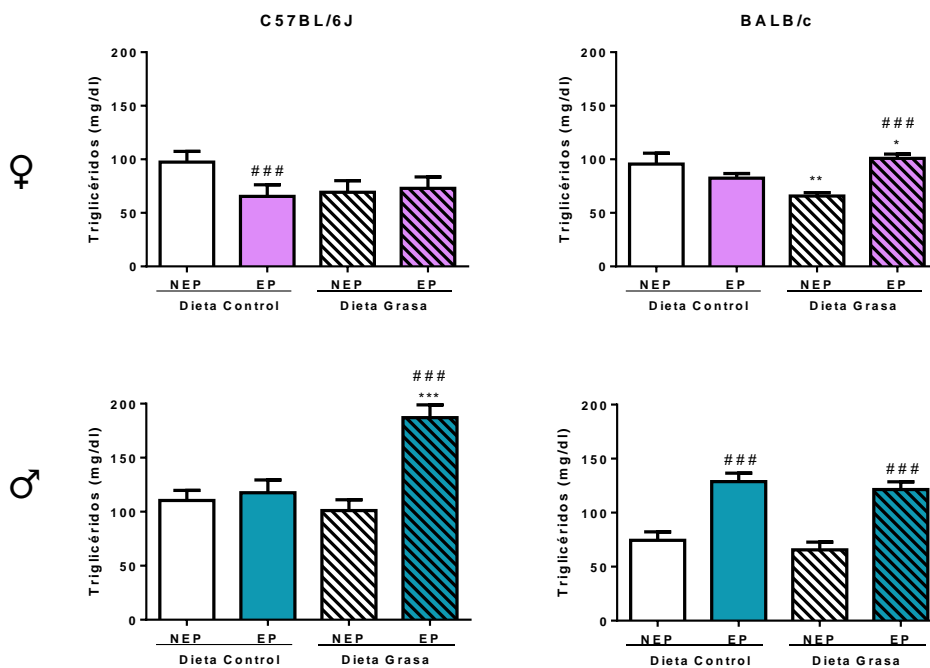


**Figura 49: Colesterol total medido en el plasma de ratones de 28 semanas de vida.** A la izquierda cepa C57BL/6J, derecha BALB/C, panel superior hembras, inferior machos. \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$  DC vs DG en ratones que recibieron un mismo tratamiento prenatal. ### $p < 0.001$ , # $p < 0.05$  NEP vs EP evaluando dentro de los grupos de ratones que recibieron la misma dieta. Los datos están expresados como media  $\pm$  error standard de la media. El N utilizado fue de 5 animales por grupo para la cepa C57BL/6J y de 7 para los BALB/c.

### Triglicéridos

Al igual que en el caso del colesterol total, a las 28 semanas de vida se determinaron los triglicéridos en plasma. Analizando la figura 50, los machos EP+DG C57BL/6J presentan mayores niveles de triglicéridos al compararlos con el grupo EP+DC (EP:  $p < 0.001$  DC vs DG) y el grupo NEP+DG (DG:  $p < 0.01$  NEP vs EP), efecto que no se evidenciaba cuando los ratones consumieron una DC. En las hembras de la misma cepa, al alimentarlas con una DG no se observan cambios significativos en los niveles de triglicéridos en plasma. En la cepa

BALB/c, los niveles de triglicéridos son mayores en el grupo EP independientemente de la dieta en el caso de los machos (DG:  $p < 0.001$  NEP vs EP). Las hembras BALB/c EP+DG tienen mayores niveles de triglicéridos que las que fueron estresadas prenatalmente pero que consumieron una DC (EP:  $p < 0.05$  DC vs DG) y, por el contrario, las hembras NEP+DG presentan menores niveles de triglicéridos que aquellas que no fueron estresadas prenatalmente, pero que consumieron una DC (NEP  $p < 0.01$  DC vs DG). Finalmente, evaluando dentro del grupo de animales que consumió una DG, se hacen evidentes efectos que no se observaban cuando los animales consumieron una DC: las hembras EP+DG presentan mayores niveles de triglicéridos en plasma en el grupo control (DG:  $p < 0.001$  NEP vs EP).



**Figura 50: Niveles de triglicéridos en plasma al momento del sacrificio.** A la izquierda cepa C57BL/6J, derecha BALB/C, panel superior hembras, inferior machos. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  mismo tratamiento prenatal, DC vs DG. ### $p < 0.001$  misma dieta estresados prenatalmente (EP) vs no estresados prenatalmente (NEP). Los datos están expresados como media  $\pm$  error standard de la media. El N utilizado fue de 5 animales por grupo para la cepa C57BL/6J y de 7 para los BALB/c.

### Corticosterona

Se presentan los resultados preliminares de la medición de corticosterona en plasma mediante HPLC (figura 51). Como la medición se realizó sobre un pool, utilizando 3 animales por grupo, no se pudo realizar el análisis estadístico.

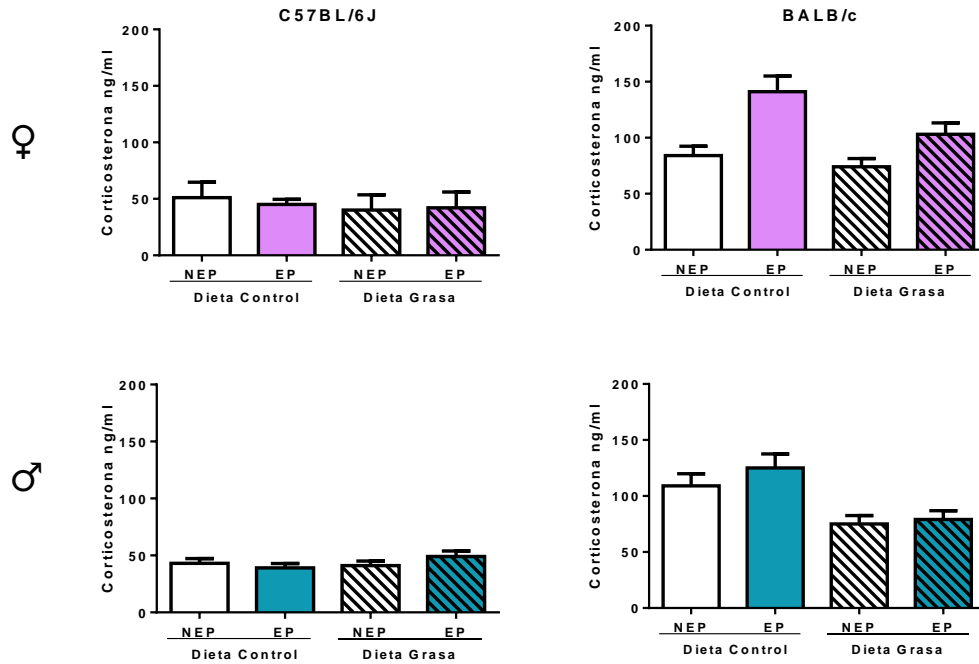


Figura 51: Niveles de corticosterona preliminares en plasma obtenido al momento del sacrificio (28 semanas de vida). A la izquierda cepa C57BL/6J, derecha BALB/c. Panel superior hembras, inferior machos. Los datos están expresados como media  $\pm$  error standard de la media (calculado como un 10%). Se realizó un pool con 3 animales por grupo para cada cepa.

## PARTE IIB: EFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL Y EL CONSUMO DE DIETA GRASA A NIVEL MOLECULAR

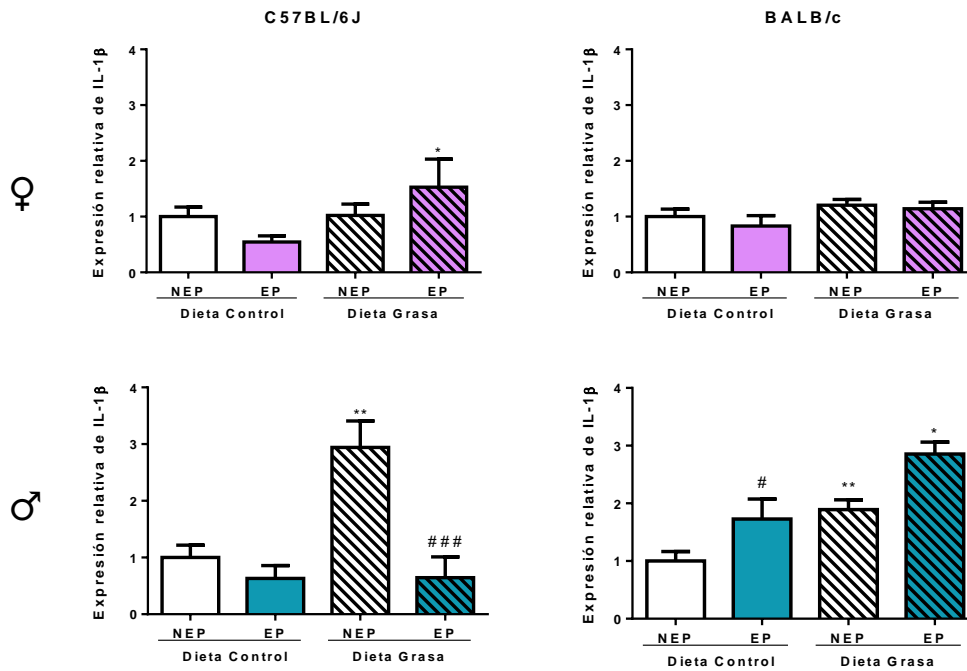
### TEJIDO ADIPOSO

*Genes relacionados con la inflamación: IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$*

Como se puede observar en la figura 52, la expresión de IL-1 $\beta$  en las hembras C57BL/6J aumenta entre las estresadas prenatalmente, que fueron alimentadas con una DG, respecto de las alimentadas con la DC (EP:  $p < 0.05$  DC vs DG). En el caso de los machos de la misma cepa, observamos que los NEP alimentados con DG mostraron un aumento en la expresión de este gen (NEP:  $p < 0.05$  DC vs DG), mientras que en los EP+DG no se observaron diferencias debidas a la dieta, a pesar de que los niveles de expresión fueron más bajos respecto de los NEP+DG (DG:  $p < 0.001$  NEP vs EP).

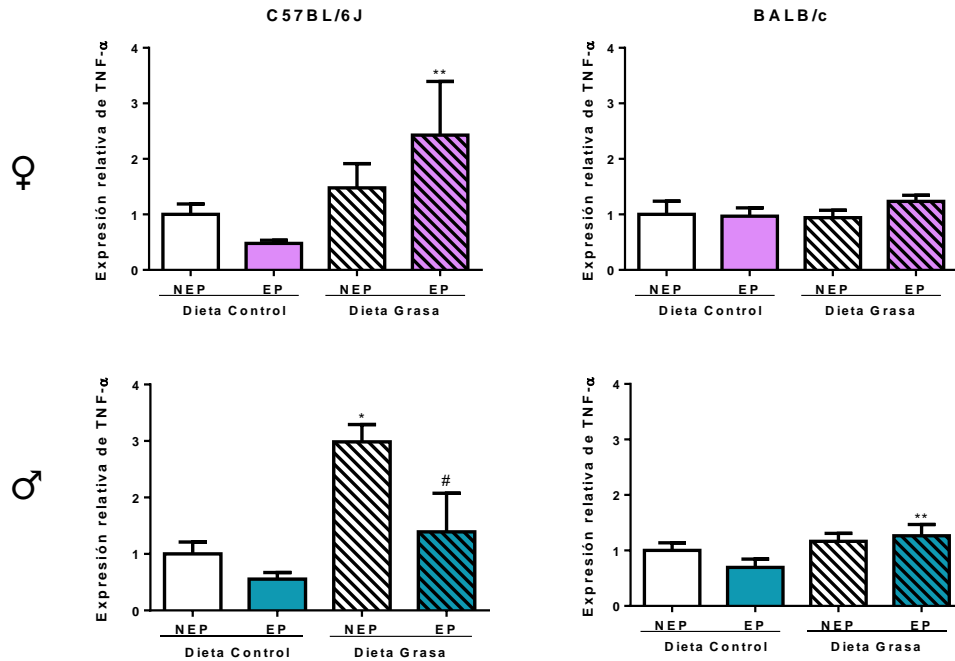
Las hembras BALB/c no mostraron alteraciones en la expresión génica debidas ni al tratamiento prenatal, ni a la dieta, ni a la interacción de ambos. Los machos de la misma cepa presentaron un aumento de la expresión de esta interleuquina respecto a los grupos alimentados con DC (NEP:  $p < 0.01$  DC vs DG; EP:  $p < 0.05$

DC vs DG), previamente, habíamos observado que el tratamiento prenatal *per se* producía un aumento de la expresión de este gen.



**Figura 52: Niveles de expresión de IL-1β.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del Tejido adiposo de los ratones tratados o no, se determinaron los niveles de RNAm de IL-1β, utilizando como gen normalizador GAPDH. Los resultados expresan la media ± EEM relativizado al control. ###p<0.001 NEP vs EP en ratones que consumieron la misma dieta; \*\*p<0.01, \*p<0.05 DC vs DG mismo tratamiento prenatal; N=5 para cada grupo en ambas cepas.

La expresión de TNF-α varía significativamente en el grupo de ratones que consumió una DG (figura 53). Entre los animales de la cepa C57BL/6J, en las hembras EP+DG la expresión de TNF-α aumenta significativamente al compararlas con las hembras que recibieron el mismo tratamiento prenatal, pero que consumieron una DC (EP: p<0.01 DC vs DG). Una respuesta similar se observó en los machos NEP+DG donde obtuvimos que la expresión de TNF-α aumentaba respecto del control (NEP: p<0.05 DC vs DG). Además, evaluando dentro del grupo que consumió una DG, se observa que los machos EP tienen la expresión disminuida respecto del control NEP+DG (DG: p<0.05 NEP vs EP). Por último, en la cepa BALB/c solo se observan diferencias significativas en los machos EP que consumieron una DG, donde la expresión de TNF-α aumenta significativamente al compararlos con el grupo que recibió el mismo tratamiento prenatal pero que consumió una DC (EP: p<0.01 DC vs DG).

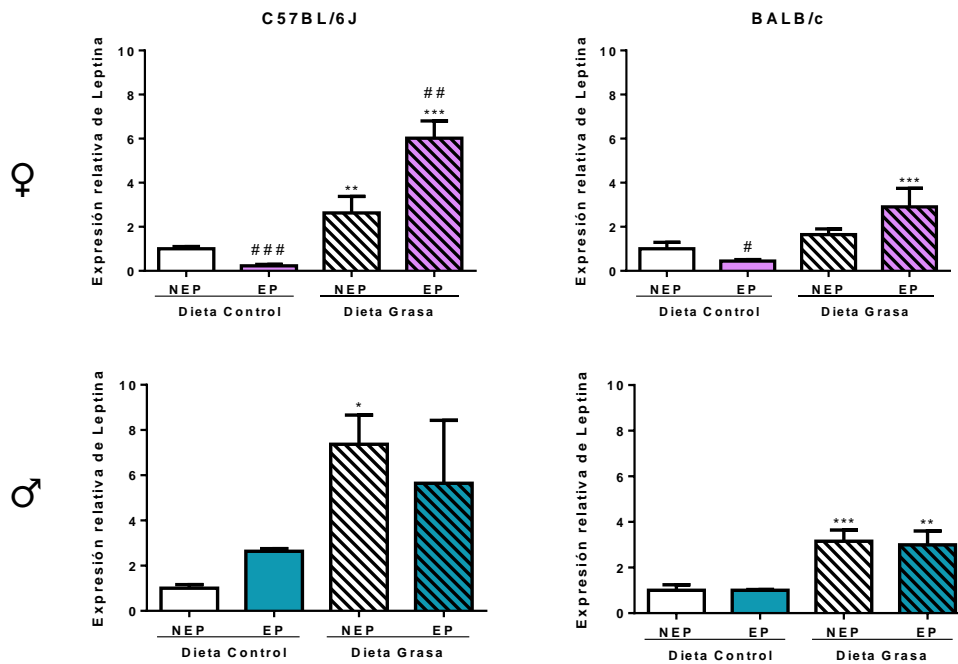


**Figura 53: Niveles de expresión de TNF- $\alpha$ .** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del Tejido adiposo de los ratones tratados o no, se determinaron los niveles de RNAm de TNF- $\alpha$ , utilizando como gen normalizador GAPDH. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. # $p < 0.05$  NEP vs EP cuando los ratones consumieron la misma dieta; \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  DC vs DG cuando los ratones recibieron el mismo tratamiento prenatal; N=3 para cada grupo de la cepa C57BL/6J y N=5 para cada grupo de la cepa BALB/c.

### Adipoquinas

Evaluando la expresión de leptina en la figura 54, puede observarse, en líneas generales, que aumenta cuando los animales consumieron una DG. En la cepa C57BL/6J, la expresión de leptina en las hembras es mayor respecto de aquellas que consumieron una DC, independientemente del tratamiento prenatal recibido (NEP:  $p < 0.01$  DC vs DG; EP:  $p < 0.001$  DC vs DG). A diferencia de lo que se había observado en el grupo que consumió una DC en donde la expresión de leptina disminuía en las hembras EP, en este caso cuando consumen una DG la expresión de leptina en las hembras EP es mayor respecto de su control NEP (DG:  $p < 0.01$  NEP vs EP). Los machos NEP+DG de esta cepa tienen mayores niveles de leptina que aquellos que consumieron una DC (NEP:  $p < 0.05$  DC vs DG). En la cepa BALB/c, las hembras EP que consumieron una DG tienen mayor expresión de leptina respecto de aquellas que consumieron una DC (EP:  $p < 0.001$  DC vs DG). En el caso de los machos se observa el mismo comportamiento, pero para todos los animales que consumieron una DG

independientemente el tratamiento prenatal recibido (NEP:  $p < 0.001$  DC vs DG; EP:  $p < 0.01$  DC vs DG).



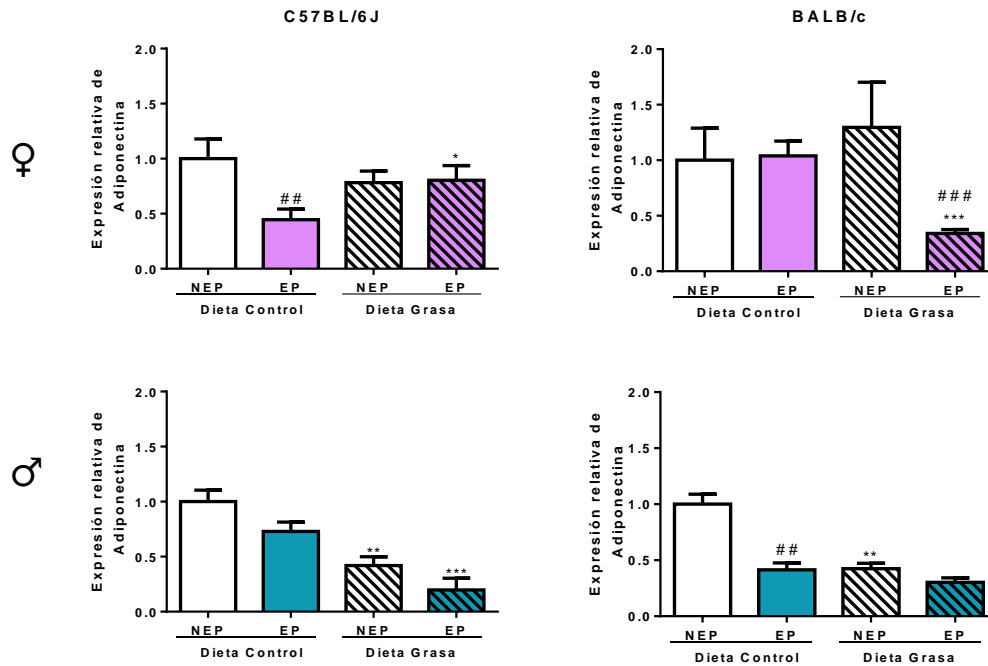
**Figura 54: Niveles de expresión de leptina.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del Tejido adiposo de los ratones tratados o no, se determinaron los niveles de RNAm de leptina, utilizando como gen normalizador GAPDH. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. ## $p < 0.01$  NEP vs EP cuando los ratones consumieron la misma dieta; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  DC vs DG cuando los animales fueron sometidos al mismo tratamiento prenatal; N=3 para cada grupo de la cepa C57BL/6J y N=5 para cada grupo de la cepa BALB/c.

En la figura 55, se representa la expresión de adiponectina. Entre los animales de la cepa C57BL/6J, cuando consumen una DG se observan comportamientos opuestos según el sexo. Para las hembras EP aumenta la expresión de esta adipoquina al compararlas con aquellas que consumieron una DC (EP:  $p < 0.05$  DC vs DG); mientras que en los machos que consumieron una DG, independientemente del tratamiento prenatal recibido, la expresión de adipoquina disminuye respecto de aquellos que consumieron una DC (NEP:  $p < 0.01$  DC vs DG; EP:  $p < 0.001$  DC vs DG).

En la cepa BALB/c, las hembras EP que consumieron una DG presentan una expresión disminuida de adiponectina, tanto al compararlas con las hembras que consumieron una DC (EP:  $p < 0.001$  DC vs DG), como con aquellas que consumieron la misma dieta pero que no fueron estresadas prenatalmente (DG:  $p < 0.001$  NEP vs EP). Finalmente, los machos NEP que consumieron una DG

presentan menores niveles de expresión de esta adipoquina al compararlos con aquellos que consumieron una DC (NEP:  $p < 0.01$ , DC vs DG).

Las diferencias significativas debidas al tratamiento prenatal, vistas anteriormente en las hembras EP+DC C57BL/6J y en los machos EP+DC BALB/c, se pierden cuando los animales consumen una DG.

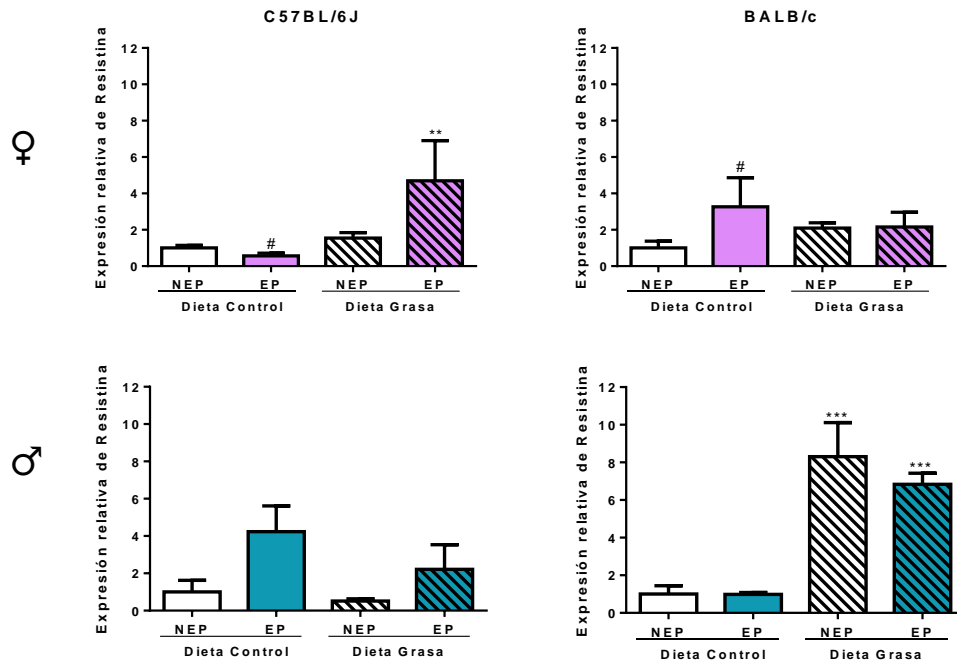


**Figura 55: Niveles de expresión de adiponectina.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del tejido adiposo de los ratones tratados o no, se determinaron los niveles de RNAm de adiponectina, utilizando como gen normalizador GAPDH. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. ### $p < 0.001$ , ## $p < 0.01$  NEP vs EP en animales que consumieron una misma dieta; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  DC vs DG cuando los animales recibieron el mismo tratamiento prenatal; N=4 para cada grupo de la cepa C57BL/6J y N=5 para cada grupo de la cepa BALB/c.

En la figura 56 se muestra la expresión relativa de resistina. En las hembras de la cepa C57BL/6J, se observa un aumento significativo de la expresión de resistina en el grupo EP que consumió una DG al compararlo con el grupo EP, pero que consumió una DC (EP:  $p < 0.01$  DC vs DG). En los machos de esta cepa las diferencias en la expresión de resistina no llegaron a ser significativas en alguno de los tratamientos. En la cepa BALB/c, la expresión de esta adipoquina aumenta significativamente en el grupo de machos BALB/c que consumió una DG, independientemente del tratamiento prenatal recibido, cuando se los compara con aquellos que consumieron una DC (NEP:  $p < 0.001$  DC vs DG; EP:



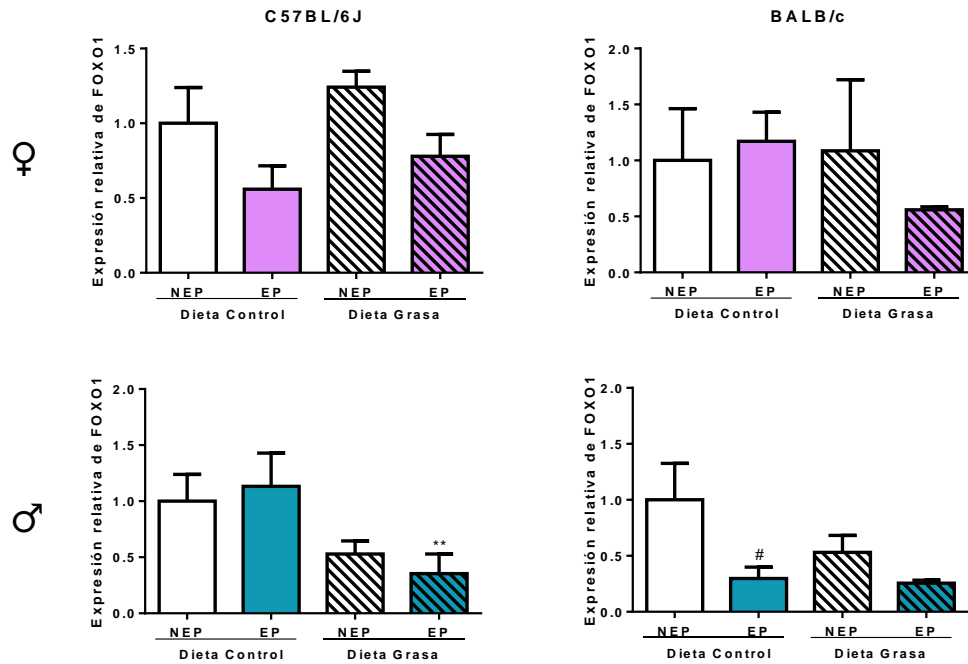
$p < 0.001$  DC vs DG). Por último, las hembras de esta cepa no muestran cambios significativos en la expresión de resistina al ingerir una DG.



**Figura 56: Niveles de expresión de resistina.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del tejido adiposo de los ratones tratados o no, se determinaron los niveles de RNAm de resistina, utilizando como gen normalizador GAPDH. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. # $p < 0.05$  NEP vs EP cuando los animales consumieron una misma dieta; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  DC vs DG cuando los animales recibieron el mismo tratamiento prenatal; N=4 para cada grupo de la cepa C57BL/6J, N=3 para las hembras BALB/c y N=5 para los machos BALB/c.

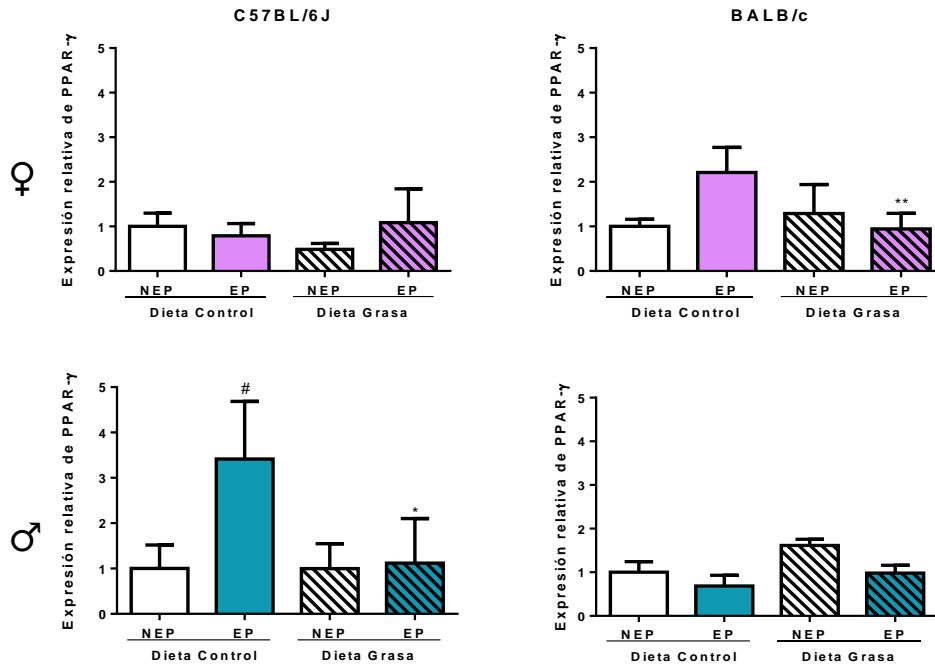
*Genes relacionados con el metabolismo energético: FOXO1 y PPAR- $\gamma$*

Como se mencionó previamente, analizamos dos genes que están involucrados en el metabolismo energético. En la figura 57 se representa la expresión relativa de FOXO1. En los machos EP de la cepa C57BL/6J la expresión de este gen disminuye cuando los animales consumen una DG respecto de aquellos EP pero que consumieron una DC (EP:  $p < 0.01$  DC vs DG). En la cepa BALB/c, no se observan cambios significativos en la expresión de FOXO1 cuando los animales consumieron una DG. En los machos EP+DC BALB/c, las alteraciones que ya habíamos mencionado debidas solamente al estrés prenatal (disminución de la expresión de FOXO1), no se acentuó por la interacción entre la dieta y el tratamiento prenatal.



**Figura 57: Niveles de expresión de FOXO1.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del tejido adiposo de los ratones tratados o no, se determinaron los niveles de RNAm de FOXO1, utilizando como gen normalizador GAPDH. Los resultados expresan la media ± EEM relativizado al control. # $p < 0.05$  NEP vs EP cuando los animales consumieron una misma dieta; \*\* $p < 0.01$  DC vs DG cuando los animales recibieron el mismo tratamiento prenatal. N=5 para cada grupo en ambas cepas.

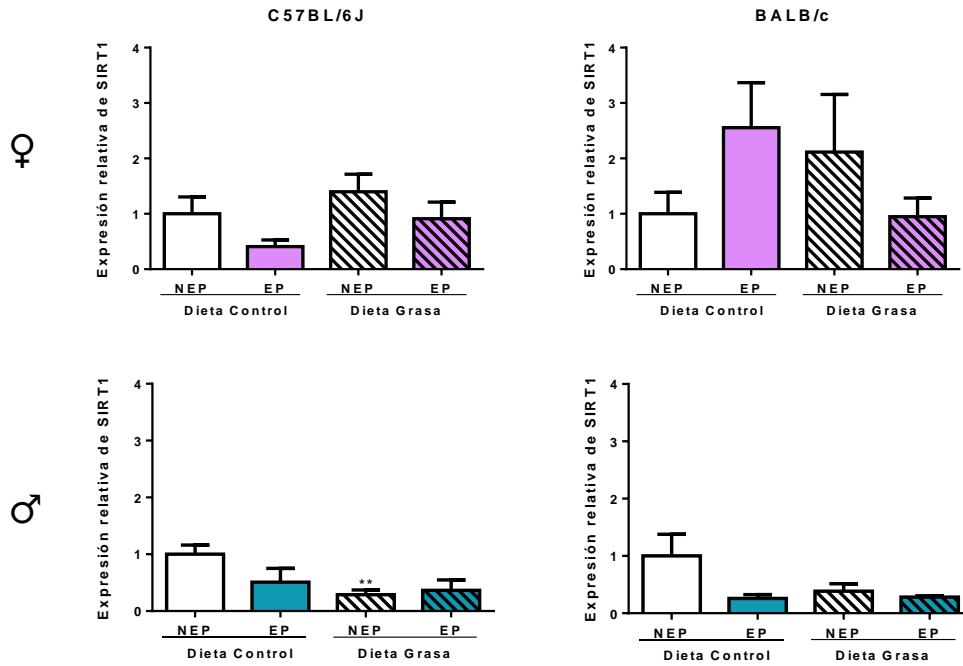
El otro gen evaluado, relacionado con el metabolismo energético, fue PPAR- $\gamma$ . En la figura 58, puede observarse que este gen solo mostró una disminución en su expresión en los machos C57BL/6J EP cuando consumieron una DG al compararlos con aquellos que consumieron una DC (EP:  $p < 0.05$  DC vs DG) y los mismo sucedió en las hembras BALB/c EP+DG (EP:  $p < 0.01$  DC vs DG).



**Figura 58: Niveles de expresión de PPAR-γ.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del tejido adiposo de los ratones tratados o no, se determinaron los niveles de RNAm de PPAR-γ, utilizando como gen normalizador GAPDH. Los resultados expresan la media ± EEM normalizado al control. #p<0.05 NEP vs EP cuando los animales consumieron la misma dieta; \*\*p<0.01, \*p<0.05 DC vs DG cuando los animales recibieron el mismo tratamiento prenatal; N=5 para cada grupo en cada cepa.

*Gen relacionado con la acción de la insulina: SIRT1*

La expresión de SIRT1, figura 59, solo se ve afectada en los machos NEP C57BL/6J en donde disminuye significativamente cuando los ratones consumen una DG, al compararlos con el mismo grupo pero que consumió una DC (NEP: p<0.01 DC vs DG).



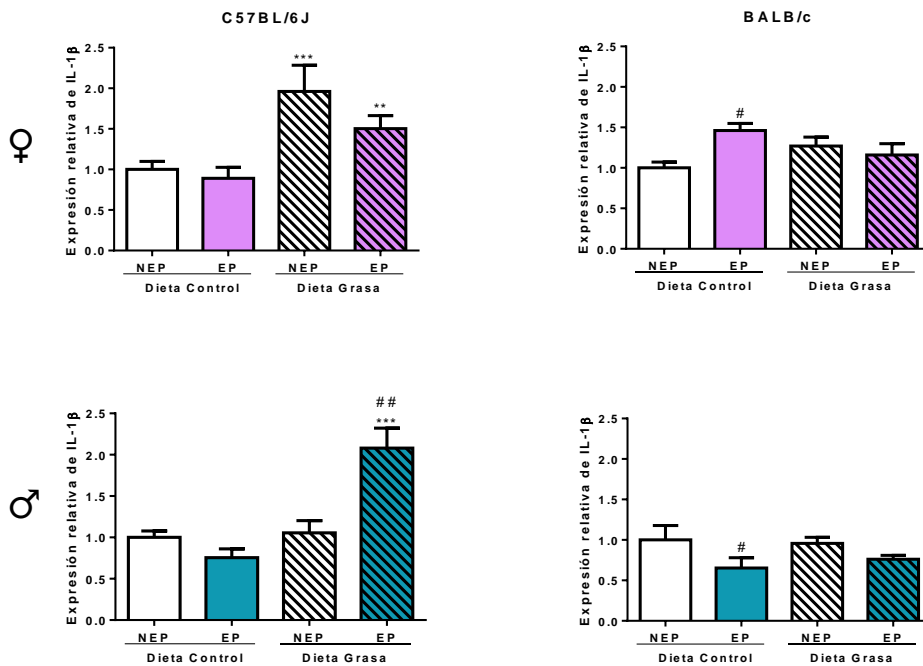
**Figura 59: Niveles de expresión de SIRT1.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del tejido adiposo de los ratones tratados o no, se determinaron los niveles de RNAm de SIRT1, utilizando como gen normalizador GAPDH. Los resultados expresan la media ± EEM relativizado al control. \*\* $p < 0.01$  DC vs DG cuando el animal recibió el mismo tratamiento prenatal; N=3 para cada grupo en cada cepa.

## HÍGADO

### *Genes relacionados con la inflamación: IL-1 $\beta$ e IL-4*

Se determinaron los niveles de expresión por qPCR de IL-1 $\beta$  (figura 60), en este caso cuando los animales consumieron una DG solamente la cepa C57BL/6J mostró una expresión significativamente distinta, mientras que para la cepa BALB/c no hubo variaciones dadas por la dieta sino que las observadas solo fueron debidas al tratamiento prenatal cuando los animales consumieron una DC.

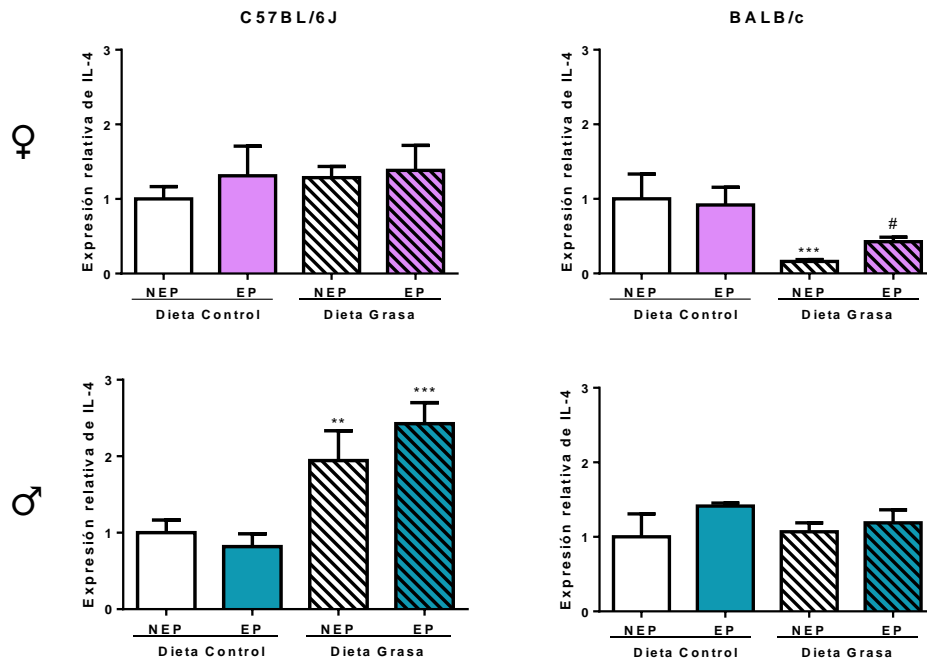
Los machos EP C57BL/6J que consumieron una DG muestran niveles elevados de esta citoquina al compararlos con los machos EP que recibieron una DC (EP:  $p < 0.001$  DC vs DG), además los machos EP+DG también tienen valores elevados significativos de IL-1 $\beta$  al compararlos con los valores de los machos NEP que recibieron la misma DG (DG:  $p < 0.01$  NEP vs EP). Por otro lado, las hembras de esta cepa, independientemente del tratamiento prenatal recibido, al consumir una DG muestran una expresión aumentada de esta citoquina (NEP:  $p < 0.001$  DC vs DG; EP:  $p < 0.01$  DC vs DG).



**Figura 60: Niveles de expresión de IL-1 $\beta$  en el hígado de ratones estresados prenatalmente y alimentados con una dieta grasa.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del hígado de los ratones EP o NEP y alimentados con una DG o una DC, se determinaron los niveles de RNAm de IL-1 $\beta$ , utilizando como gen normalizador PPIA. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01 DC vs DG mismo tratamiento prenatal. ##p<0.01 NEP vs EP para ratones que consumieron la misma dieta; N=7 para cada grupo en cada cepa.

Otra citoquina evaluada fue IL-4, citoquina antiinflamatoria. Los niveles de expresión de IL-4 aumentan significativamente en los machos de la cepa C57BL/6J cuando los ratones consumen una DC, independientemente del tratamiento prenatal recibido, al compararlos con los ratones alimentados con una DC (NEP: p<0.01 DC vs DG; EP: p<0.001 DC vs DG). En las hembras de esta cepa no se observaron diferencias significativas dadas por la dieta consumida, ni por el tratamiento prenatal recibido.

Continuando con la cepa BALB/c, las hembras NEP que consumieron una DG tienen la expresión de esta citoquina disminuida, al compararlas con las hembras NEP alimentadas con una DC (NEP: p<0.001 DC vs DG). Por otro lado, las hembras EP de esta cepa que consumieron una DG, presentan una expresión de IL-4 aumentada al compararlas con el grupo control (DG: p<0.05 NEP vs EP). Los machos de esta cepa no muestran diferencias significativas en la expresión de IL4, figura 61.



**Figura 61: Niveles de expresión de IL-4 en ratones estresados prenatalmente (EP) o no (NEP) y alimentados con una dieta alta en energía (DG) o no.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del hígado de los ratones tratados o no, se determinaron los niveles de RNAm de IL-4, utilizando como gen normalizador PPIA. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. # $p < 0.05$  NEP vs EP en ratones alimentados con la misma dieta; \*\*\* $p < 0.001$  y \*\* $p < 0.01$  DC vs DG en ratones que recibieron el mismo tratamiento prenatal; N=5 para cada grupo de la cepa C57BL/6J y N=7 para cada grupo de la cepa BALB/c.

*Genes relacionados con el metabolismo energético: PGC1- $\alpha$  y PPAR- $\alpha$*

En la figura 62, se muestra la expresión total del gen PGC1- $\alpha$ . Como ya habíamos observado por el efecto del tratamiento prenatal, otra vez obtuvimos el mismo comportamiento en los machos de ambas cepas: los animales NEP alimentados con una DG, tienen una expresión menor al compararlos con el grupo control alimentado con una DC (C57BL/6J NEP:  $p < 0.05$  DC vs DG; BALB/c NEP:  $p < 0.001$  DC vs DG). Por último, las hembras EP BALB/c que consumieron una DG, tienen niveles de expresión menor de este coactivador al compararlas con los ratones que recibieron el mismo tratamiento prenatal pero que consumieron una DC (EP:  $p < 0.001$  DC vs DG).

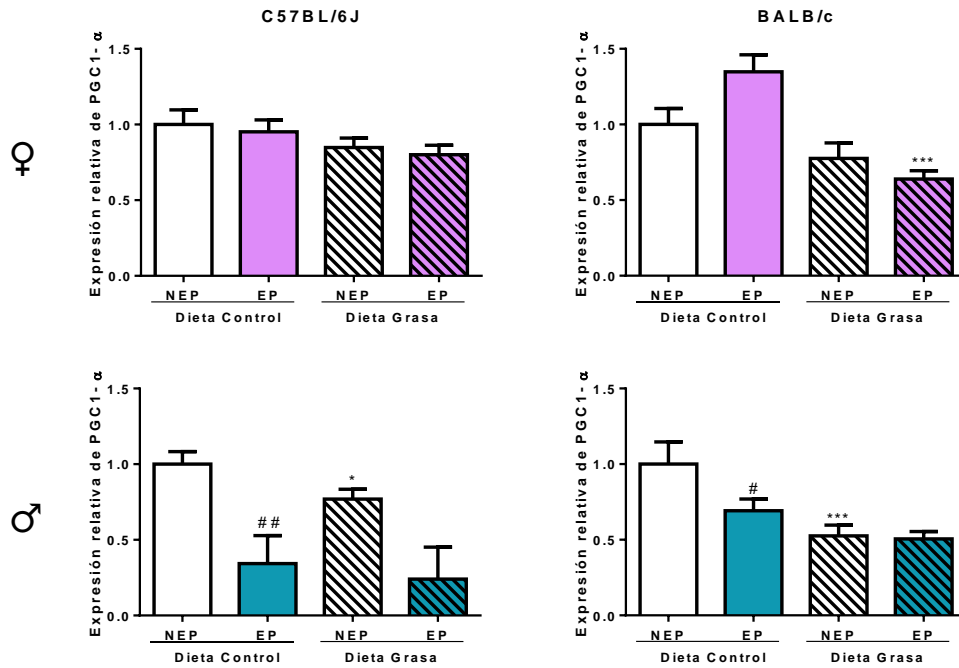
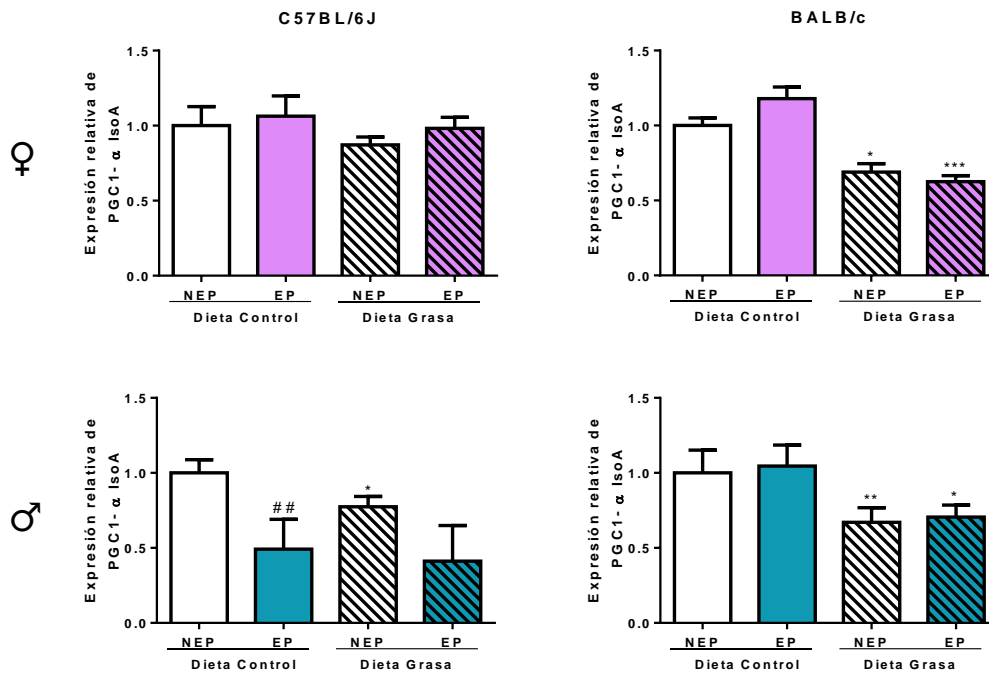


Figura 62: Niveles de expresión de PGC1- $\alpha$  total en ratones que fueron estresados prenatalmente (EP) o no (NEP) y que consumieron una dieta alta en energía (DG) o no (DC). Mediante qPCR a partir de DNAC obtenido del hígado de los ratones tratados o no, se determinaron los niveles de RNAm de PGC1- $\alpha$ , utilizando como gen normalizador PPIA. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizados al control. ## $p$ <0.01, # $p$ <0,05 NEP vs PS en ratones que consumieron una misma dieta; \*\*\* $p$ <0.001, \*\* $p$ <0.01 DC vs DG en ratones que recibieron el mismo tratamiento prenatal; N=7 para cada grupo en cada cepa.

En la figura 63 se observan los niveles de expresión relativos de PGC1- $\alpha$ IsoA. En la cepa C57BL/6J, solo se observaron diferencias significativas en el caso de los machos NEP que consumieron una DG y presentan una expresión relativa disminuida de PGC1- $\alpha$ Iso A, al compararlos con los machos NEP pero que consumieron una DC (NEP:  $p$ <0.05 DC vs DG). En las hembras de esta cepa la expresión de esta isoforma del activador no varía ni por el tratamiento prenatal recibido ni por la dieta consumida.

En ambos sexos de la cepa BALB/c, los animales NEP y que consumieron una DG, tienen niveles de expresión mayores de PGC1- $\alpha$ IsoA respecto del control que consumió una DC (NEP:  $p$ <0.05 DC vs DG para las hembras; NEP:  $p$ <0.01 DC vs DG para los machos). Por el contrario, cuando las hembras EP consumieron una DG, observamos que tienen una menor expresión de este coactivador al compararlas con aquellas que consumieron una DC (EP:  $p$ <0.001 DC vs DG), mientras que para el caso de los machos EP+DG la expresión de la

isoforma A de PGC1- $\alpha$  es mayor respecto del grupo que consumió una DC (EP:  $p < 0.05$  DC vs DG).



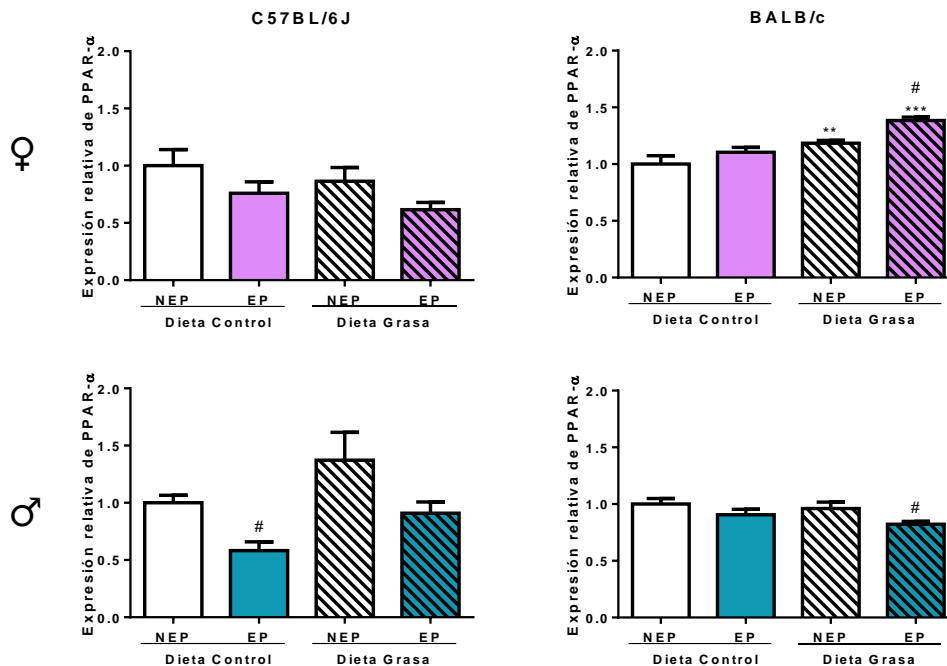
**Figura 63: Niveles de expresión de PGC1- $\alpha$  Isoforma A, en ratones estresados prenatalmente (EP) o no (NEP) y que consumieron una dieta grasa (DG) o no (DC).** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del hígado de los ratones tratados o no, se determinaron los niveles de RNAm de PGC1- $\alpha$ , utilizando como gen normalizador PPIA. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. ## $p < 0.01$  NEP vs EP misma dieta consumida; \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  DC vs DG en animales que recibieron el mismo tratamiento prenatal; N=7 para cada grupo de cada cepa.

En la figura 64 se muestra la expresión relativa de PPAR- $\alpha$  en el hígado de ambas cepas. En ninguno de los dos sexos de la cepa C57BL/6J se registraron diferencias significativas cuando los ratones fueron alimentados con una DG, más allá de la observación previa de una disminución en la expresión DE PPAR- $\alpha$  en los machos EP+DC.

Se registró un aumento significativo en la expresión de este receptor en el grupo de hembras BALB/c que fueron alimentadas con una DG al compararlas con las hembras que consumieron una DC, independientemente del tratamiento prenatal recibido (NEP:  $p < 0.01$  DC vs DG; EP:  $p < 0.001$  DC vs DG). Además, las hembras EP de esta cepa que consumieron una DG presentan una expresión relativa mayor de PPAR- $\alpha$ , al compararlas con aquellas que consumieron la misma dieta pero no fueron sometidas a estrés durante la gestación (DG:  $p < 0.05$  NEP vs EP). Al contrario de lo que se observa en las hembras BALB/c, los



machos EP BALB/c que consumieron una DG presentaron una expresión disminuida de PPAR- $\alpha$  respecto del control (DG:  $p < 0.05$  NEP vs EP).



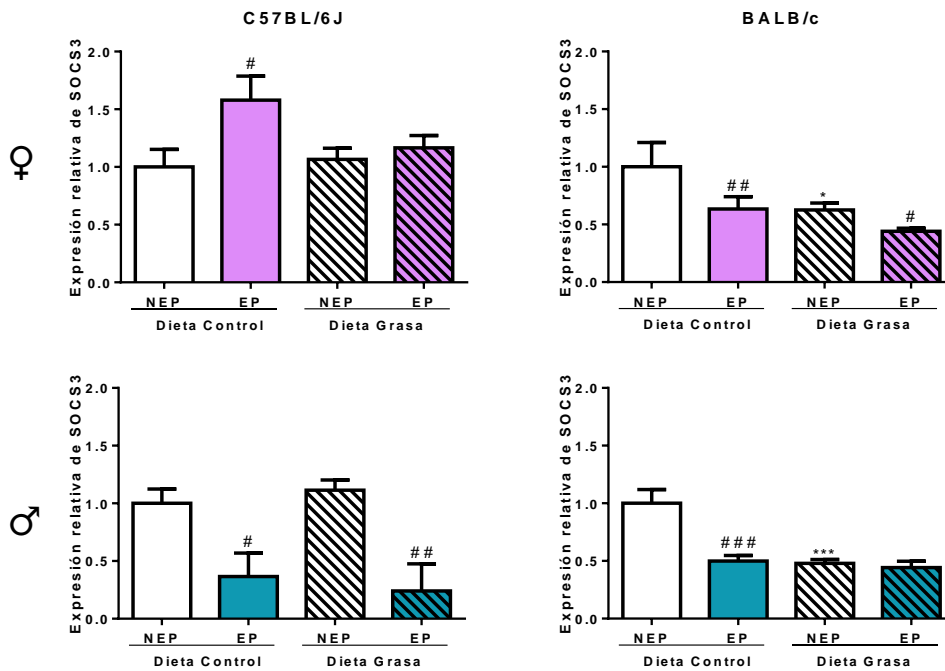
**Figura 64:** Niveles de expresión de PPAR- $\alpha$  en el hígado de ratones estresados prenatalmente (EP) o no y que recibieron una dieta grasa (DG) o una dieta control (DC). Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del hígado de los ratones tratados o no, se determinaron los niveles de RNAm de PPAR- $\alpha$ , utilizando como gen normalizador PPIA. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  DC vs DG en ratones que recibieron el mismo tratamiento prenatal. # $p < 0.05$  NEP vs EP en ratones que consumieron la misma dieta; N=7 para cada grupo en cada cepa.

#### *Genes relacionados con la acción de la insulina: SOCS3, SIRT1 y SIRT3*

Al evaluar la expresión de SOCS3 (figura 65) en los ratones de la cepa C57BL/6J, se observa que los machos EP mantienen el mismo patrón observado cuando los animales consumieron una DC: la expresión de SOCS3 disminuye respecto de NEP (DG:  $p < 0.01$  NEP vs EP). En las hembras de esta cepa no se observaron diferencias significativas debidas al consumo de una DG.

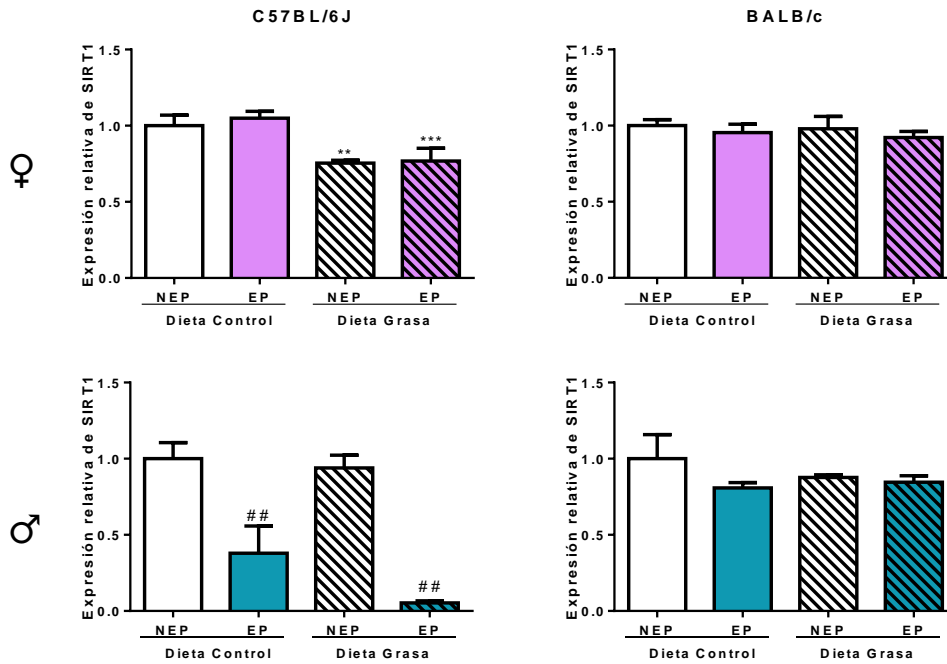
Continuando con la cepa BALB/c, tanto las hembras como los machos NEP que consumieron una DG, presentan una expresión disminuida de SOCS3 respecto de aquellos con el mismo tratamiento prenatal pero que consumieron una DC (NEP:  $p < 0.05$  DC vs DG para las hembras; EP:  $p < 0.001$  DC vs DG para los machos). Finalmente, las hembras EP+DG de esta cepa muestran una expresión disminuida de este supresor cuando se las compara con aquellas que

consumieron la misma dieta pero que no fueron estresadas prenatalmente (DG:  $p < 0.05$  NEP vs EP).



**Figura 65:** Niveles de expresión de SOCS-3 en el hígado de ratones estresados prenatalmente (EP) o no (NEP) y que consumieron una dieta grasa (DG) o una dieta control (DC). Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del hígado de los ratones tratados o no, se determinaron los niveles de RNAm de SOCS-3, utilizando como gen normalizador PPIA. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizado al control. ## $p < 0.01$ , # $p < 0.05$  NEP vs EP en animales que consumieron una misma dieta; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.05$  DC vs DG en animales que fueron sometidos al mismo tratamiento prenatal; N=7 para cada grupo en cada cepa.

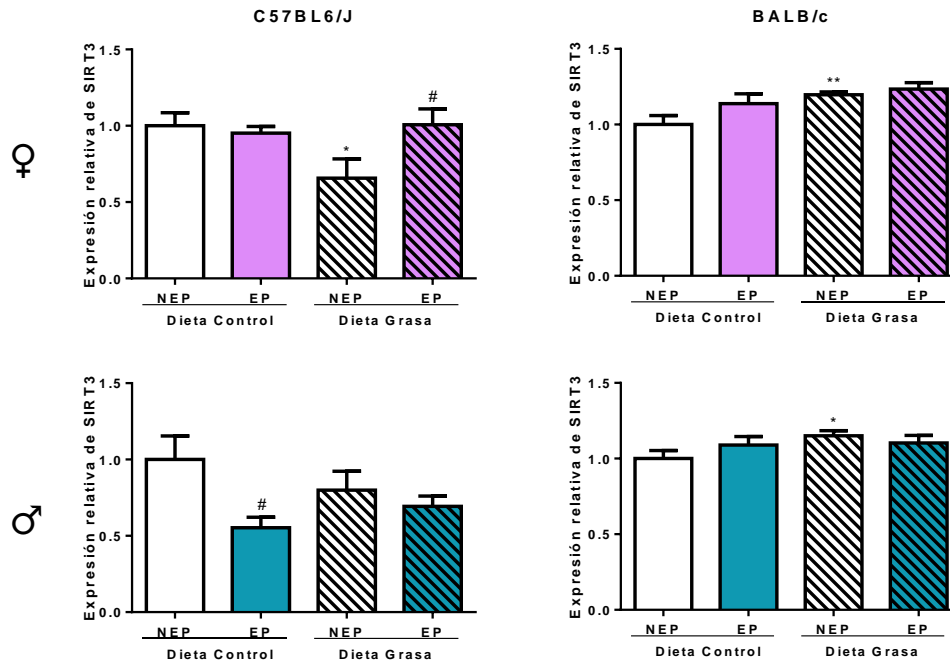
La expresión de SIRT1, representada en la figura 66, solo cambia significativamente en la cepa C57BL6/J y no presenta variaciones significativas en la cepa BALB/c. Se observa que en las hembras C57BL/6J que consumieron una DG disminuye la expresión de SIRT1 al compararlas con aquellas que consumieron una DC, y este efecto es independiente del tratamiento prenatal recibido (NEP:  $p < 0.01$  DC vs DG; EP:  $p < 0.001$  DC vs DG). Por último, se observa que los machos EP de esta cepa, que consumieron una DG, continúan con el patrón de expresión ya observado en el grupo que consumió una DC, en donde la expresión de SIRT1 disminuye significativamente en aquellos ratones que fueron EP (DG:  $p < 0.01$  NEP vs EP).



**Figura 66:** Niveles de expresión de SIRT1 en el hígado de ratones estresados prenatalmente (EP) o no (NEP) y que consumieron una dieta grasa (DG) o una dieta control (DC). Mediante qPCR a partir de DNAC obtenido del hígado de los ratones tratados o no, se determinaron los niveles de RNAm de SIRT1, utilizando como gen normalizador PPIA. Los resultados expresan la media ± EEM relativizados al control. ##p<0.01 NEP vs EP en animales que consumieron la misma dieta. \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01 DC vs DG en animales que recibieron el mismo tratamiento prenatal; N=5 para cada grupo de la cepa C57BL/6J y N=7 para cada grupo de la cepa BALB/c.

En la figura 67 se muestra la expresión relativa de sirtuína 3. En el caso de la cepa C57BL/6J, solo se observan diferencias significativas debidas a la dieta en las hembras. La expresión de SIRT3 disminuye en las hembras NEP cuando consumen una DG, al compararlas con aquellas que consumieron una DC (NEP: p<0.05 DC vs DG). Por otro lado, evaluando dentro del grupo de hembras que consumió una DG, la expresión de SIRT3 aumenta en las hembras EP (DG: p<0.05 NEP vs EP).

En el caso de la cepa BALB/c, en ambos sexos la expresión de SIRT3 aumenta en el grupo de ratones NEP que consumió una DG al compararlos con el control (NEP: p<0.01 DC vs DG hembras; NEP: p<0.05 DC vs DG machos).



**Figura 67:** Niveles de expresión de SIRT3 en el hígado de ratones estresados prenatalmente (EP) o no (NEP) y que consumieron una dieta grasa (DG) o una dieta control (DC). Mediante qPCR a partir de DNAC obtenido del hígado de los ratones tratados o no, se determinaron los niveles de RNAm de SIRT3, utilizando como gen normalizador PPIA. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizados al control. # $p < 0.05$  NEP vs EP en animales que consumieron la misma dieta. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  DC vs DG en animales que fueron sometidos al mismo tratamiento prenatal; N=7 para cada grupo en cada cepa.

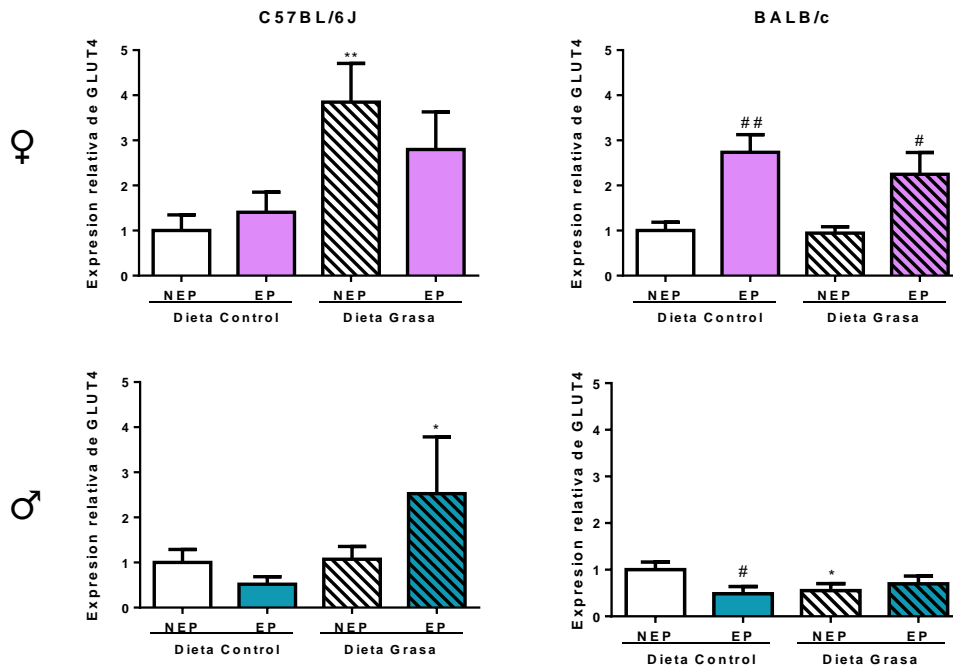
## MÚSCULO ESQUELÉTICO

### GLUT4

En la figura 68, se muestra la expresión relativa del transportador de glucosa tipo 4 determinado en el músculo esquelético de los ratones. En la cepa C57BL/6J, la expresión de GLUT4 aumenta en las hembras NEP+DG respecto de las que consumieron una DC (NEP:  $p < 0.01$  DC vs DG). Lo mismo sucede con los machos EP de esta cepa que consumieron una DG, en donde la expresión de GLUT4 aumenta respecto de los machos EP que consumieron una DC (EP:  $p < 0.05$  DC vs DG).

En el caso de la cepa BALB/c, evaluando dentro del grupo de hembras que consumieron una DG, se observa que las hembras EP presentan una mayor expresión de GLUT4 respecto de aquellas que no fueron estresadas prenatalmente (DG:  $p < 0.05$  NEP vs EP), este resultado es similar a lo que ya habíamos observado para el grupo alimentado con DC. Finalmente, los machos

NEP de esta cepa que consumieron una DG presentan una expresión de GLUT4 disminuida respecto de los que consumieron una DC (NEP:  $p < 0.05$  DC vs DG).



**Figura 68: Niveles de expresión de GLUT4 en el músculo esquelético.** Mediante qPCR a partir de DNAc obtenido del músculo esquelético de los ratones EP o no y que consumieron una DG o una DC, se determinaron los niveles de RNAm de GLUT4, utilizando como gen normalizador PPIA. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM relativizados al control. ## $p < 0.01$ , # $p < 0.05$  NEP vs EP en animales que consumieron la misma dieta. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  DC vs DG en animales que fueron sometidos al mismo tratamiento prenatal; N=7 para cada grupo en cada cepa.

# DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

El microambiente intrauterino es crítico para el desarrollo fetal, perturbaciones en el mismo pueden tener consecuencias a corto y largo plazo en las crías. Una gran cantidad de estudios demuestran que varias enfermedades metabólicas pueden originarse durante el desarrollo fetal <sup>76</sup>. Por este motivo, determinar los mecanismos que contribuyen a su desarrollo puede llevar a estrategias de tratamiento o intervenciones tempranas que permitan prevenir estos desórdenes.

Se ha observado que eventos estresantes durante la preñez temprana pueden producir abortos y malformaciones en la cría <sup>170</sup> debido, posiblemente, a los altos niveles de GCs, a la disminución de progesterona y del factor bloqueador inducido por progesterona (PIBF) y/o la baja producción de citoquinas tipo Th2. En nuestro modelo de estudio, el estrés se aplica en la última semana de gestación. Este período se corresponde con el último trimestre en humanos, por lo cual se podrían descartar consecuencias importantes a nivel morfológico debidas al estrés. De este modo, los efectos observados deberían ser menos graves que si el estresor se aplicara tempranamente durante la preñez. Se ha encontrado que el EP aplicado durante la última semana de gestación induce, principalmente, consecuencias a nivel metabólico y epigenético <sup>40,43</sup>. El estrés por inmovilización que usamos en este trabajo, es ampliamente utilizado para estudiar las alteraciones inducidas por estrés a nivel fisiológico, inmunológico y neurobiológico en mamíferos <sup>171</sup>. Es importante señalar que en el presente trabajo no observamos diferencias significativas en el número de crías nacidas, la relación entre sexos ni el tiempo de gestación. Si bien el período *in útero* fue posiblemente el más relevante en nuestro modelo, no podemos descartar el cuidado materno durante la lactancia como otro de los factores que podría afectar alguno de los parámetros estudiados; las madres estresadas podrían tener un comportamiento diferente y, por tal razón, descuidar a la cría. Esta falta de cuidado materno podría influir en el sistema inmune y endocrino de las crías <sup>172,173</sup>. Por eso, consideramos que en un futuro es necesario realizar estudios que incluyan “cross-fostering” (intercambio de crías entre los tratamientos). Sin embargo, existen numerosos trabajos en los que se demuestra que esto también puede afectar negativamente a las crías <sup>174</sup>. Por ejemplo, Matthews y colaboradores <sup>175</sup> han reportado que la realización de “cross-fostering” en

camadas de la cepa C57BL/6J produce cambios significativos a nivel metabólico y cardiovascular. Además debe considerarse que la realización de “cross-fostering” también produce alteraciones en el comportamiento materno <sup>176</sup>, lo que puede producir en las crías consecuencias aún peores que las que se quieren prevenir.

Una de las cepas elegidas para este experimento, los ratones C57BL/6J, es la cepa más utilizada para evaluaciones metabólicas debido a que es susceptible a desarrollar trastornos metabólicos ante la ingesta de una amplia variedad de dietas. Sin embargo, sin un tratamiento prenatal, se ha reportado que luego de 9 meses de ingesta de DG solo el 50% de los animales desarrolla obesidad y DBT2, los restantes desarrollan una de las dos enfermedades o ninguna de ellas <sup>177</sup>.

En el presente trabajo, estudiamos el efecto sobre las crías de la exposición *in utero* a estrés por restricción del movimiento, durante la última semana de gestación (días 14 a 21), en las cepas C57BL/6J y BALB/c. Dichas crías, a partir de las 4 semanas de vida fueron alimentadas con una DC o con una DG hasta la adultez. Observamos que la exposición al estrés en forma prenatal produce efectos metabólicos que se ponen en evidencia en la edad adulta, tales como el desarrollo de sobrepeso y alteraciones en la respuesta a la insulina. Estos efectos fueron sexo- y cepa-específicos y, en algunos casos, solo fueron evidentes ante el desafío metabólico que implica la ingesta de una DG.

En la bibliografía existen pocos trabajos enfocados a los efectos metabólicos del EP en ratones. La gran mayoría utiliza ratas y, en consecuencia, usan otros protocolos de estrés, siendo los más populares la inyección de GCs y el estrés por restricción del movimiento de manera repetida por una o dos horas, varias veces al día, en horarios aleatorios para evitar el acostumbamiento del animal.

En el modelo que hemos utilizado en este trabajo, encontramos un mayor peso corporal al destete en los animales EP de la cepa BALB/c, lo que no se observó en los C57BL/6J. En la bibliografía existen escasos trabajos que informen el peso al destete de los animales; resultados disímiles se han reportado en ratas y algunos autores reportan que el EP produce un peso corporal mayor a los controles <sup>76</sup> y, otros, un peso menor <sup>178</sup>.



En la curva de peso corporal, observamos un mayor efecto debido al EP en los machos de la cepa BALB/c, que presentaron un mayor peso corporal desde la semana 4 de vida, efecto que no se vio potenciado por el consumo de la DG hasta la semana 24.

Podemos observar que entre los animales de la cepa C57BL/6J, solo los machos presentaron un aumento de peso significativo debido al efecto combinado del EP y la DG, observándose un aumento de peso a partir de la semana 16 de vida. En cambio, cuando observamos el peso corporal de las hembras, las C57BL/6J se vieron afectadas por la combinación de ambos tratamientos, recién al finalizar el experimento (semana 28). Mientras que las BALB/c presentaron un aumento de peso debido al efecto ejercido por el EP, que se puso en evidencia al consumir la DG a partir de la semana 4, y dicho efecto fue aún mayor a partir de la semana 12 de vida. Debe recordarse que en esta cepa el peso corporal al destete fue mayor en los EP, lo que se mantuvo durante todo el experimento.

Con lo observado, podemos postular que el EP produce un efecto sensibilizador al desarrollo de sobrepeso ante la ingesta de una DG. En un trabajo realizado en ratas Sprague-Dawley (SD), inyectadas diariamente durante la última semana de gestación con GCs y cuyas crías luego fueron alimentadas con una DG, no se observaron efectos sobre el peso corporal debido al tratamiento prenatal <sup>80</sup>. Otro grupo, que estudió el efecto del EP en ratas, utilizando un modelo de estrés por restricción del movimiento 3 veces al día durante 45 minutos, a pesar de observar diferencias en el peso al nacer, a los 24 meses de edad no observaron diferencias significativas entre los sometidos a EP y el grupo control <sup>42</sup>, en dicho trabajo no se informan los pesos en tiempos previos a los 24 meses. En contraposición, Panetta y colaboradores <sup>179</sup> encontraron que el mismo modelo de EP utilizado por Lesage y colaboradores, producía una mayor sensibilidad al desarrollo de alteraciones metabólicas en machos de la cepa SD. Estas últimas observaciones guardan cierta similitud con las nuestras ya que en nuestro trabajo observamos que los machos EP BALB/c presentaron un aumento de peso debido al EP. Además, los machos EP C57BL/6J presentaron un aumento del peso corporal ante la ingesta de una DG y esta observación, se extendió a las hembras BALB/c. Nuestras observaciones guardan estrecha relación con la mencionada teoría de los “dos hits”, que propone que la exposición a EP (“primer hit”) condiciona el metabolismo ante la ingesta de una DG (“segundo hit”), observándose alteraciones recién luego de la exposición al segundo hit.

## Metabolismo glucídico y lipídico

Para la evaluación del metabolismo de la glucosa en animales, se realiza un test de tolerancia a la glucosa administrada en forma intraperitoneal u oral. Ambas vías de administración proveen información sobre la secreción de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas, estimulada por glucosa, además de la sensibilidad a la insulina del hígado y los demás órganos periféricos. Además, el test por vía oral provee información sobre la secreción intestinal de las hormonas insulínótropas como GLP-1 y GIP, pero posee mayor variabilidad debido al tiempo de vaciado gástrico que varía entre individuos. En general, la curva de tolerancia a la glucosa se realiza sobre animales ayunados durante todo el periodo de oscuridad, esto implica no solo ayunarlos unas 12 horas sino hacerlo durante el periodo de mayor actividad en los roedores. Esto genera un importante estrés, lo que influye sobre los valores de glucemia basales obtenidos. Existen publicaciones que recomiendan realizar el ayuno durante solo 6 horas (debido a la alta tasa metabólica de los roedores) y en el periodo de luz de los animales, lo que genera menos estrés, afectando menos los resultados obtenidos <sup>164</sup>. Por todos estos motivos, nosotros decidimos realizar el test de tolerancia a la glucosa mediante la administración intraperitoneal de glucosa (nuestro objetivo no involucraba la evaluación de incretinas) y luego de 6 horas de ayuno durante el período de luz. En la curva de tolerancia a la glucosa no observamos alteraciones debidas al EP.

Para la realización del test de sensibilidad a la insulina, los animales no fueron ayunados debido a que se ha reportado que en roedores, el ayuno prolongado optimiza el efecto de la insulina <sup>180-183</sup>. En este test observamos que las hembras EP C57BL/6J, alimentadas con DG, tuvieron una glucemia más elevada debido a la exposición a EP. Adicionalmente, los machos EP C57BL/6J tuvieron una glucemia mayor a los 30 y 60 minutos, independientemente de la dieta consumida. Estos grupos presentaron alteraciones en la respuesta a la insulina, que se vio reflejada en los valores de glucemia más elevados obtenidos. En la cepa BALB/c las hembras EP+DG presentaron valores de glucemia elevados a los 60 minutos post inyección. En un trabajo realizado en ratas SD, en el cual se somete a las madres gestantes a estrés por restricción del movimiento y, posteriormente, se alimenta a las crías con una DG, se reportó que el consumo de la DG por parte de los animales EP produjo una disminución de la sensibilidad a la insulina, que fue más marcada en los machos, pero el estrés

prenatal *per se* no modificó la respuesta de los animales <sup>179</sup>. En cambio, en otro trabajo en donde el EP es causado por la administración GCs y, las crías posteriormente son alimentadas con una DG, los autores no observaron cambios en la glucemia de los animales luego de recibir la inyección de insulina <sup>77</sup>. Otro trabajo previo del mismo grupo, con el mismo modelo, reportó valores de glucemia elevados en los animales con ambos tratamientos (GCs+DG) a los 60 min post inyección <sup>80</sup>.

Los niveles plasmáticos de insulina se vieron afectados por el EP+DG en los machos C57BL/6J quienes presentaron un marcado incremento de la misma. Los resultados se condicen con un trabajo previo en donde los autores observan hiperinsulinemia en ratones que fueron EP y, además, alimentados con una dieta que induce obesidad durante su vida adulta <sup>184</sup>. Algo similar se ha reportado en un estudio realizado en ratas Wistar que fueron EP (estrés crónico leve) y posteriormente alimentadas con una dieta alta en sacarosa, los autores observaron que en los machos la concentración de insulina aumentó por el efecto combinado de estrés y dieta <sup>185</sup>. En otro modelo de EP (por administración de GCs) se observó que animales alimentados con una DC presentaron hiperinsulinemia en ayunas <sup>186</sup>. Finalmente, en otro estudio realizado en ratas SD, cuando los animales solamente reciben EP no se observan cambios significativos en la concentración de insulina plasmática <sup>187</sup>.

Si consideramos en conjunto los resultados del test de sensibilidad a la insulina y la insulina plasmática, observamos que los machos EP C57BL/6J, alimentados con DG, presentan una respuesta a la insulina alterada y, sumado a esto, los mismos animales presentaron hiperinsulinemia al momento del sacrificio. Estos resultados nos indicarían que los machos EP C57BL/6J, desarrollaron IR. Estas alteraciones pueden explicarse debido a que el EP produce la reprogramación de la actividad del eje HPA y aumenta los niveles basales de GCs <sup>188-190</sup>. Los GCs inducen IR reduciendo la expresión y fosforilación de IRS-1 <sup>191</sup>; de este modo, desacoplan la señalización intracelular de los receptores de insulina y de IGF-1. Este efecto modera la actividad de proteínas involucradas en la señalización de insulina como PI3-K, PKB/AKT, lo que reduce la translocación a la membrana celular de GLUT4 en la mayoría de los tejidos <sup>192</sup>.

Al evaluar el colesterol plasmático, se observó una disminución del mismo dada en forma conjunta por el EP y el consumo de DG en las hembras de la cepa BALB/c, mientras que en los machos de esta cepa se observó un aumento

debido al EP, que fue aún mayor por la ingesta de DG. En cuanto al EP, un estudio reportó que al someter a ratas SD gestantes a un modelo de estrés social, no se encontraron diferencias en el colesterol respecto del control en ninguno de los dos sexos <sup>187</sup>. En cambio, en otro trabajo donde se combinan los efectos del EP+DG, se observó que ratas Wistar EP por restricción del movimiento y luego alimentadas con una dieta alta en sacarosa, los machos presentaron valores de colesterol más bajos al compararlos con el grupo control <sup>185</sup>, efecto que podría ser comparable con lo observado en las hembras EP+DG BALB/c. Sin embargo, ninguno de los trabajos encontrados en bibliografía coincide totalmente con nuestras observaciones, esto puede deberse a que en nuestro modelo de estudio trabajamos con ratones y no ratas, y/o a que el tipo de dieta administrada no fue la misma.

En cuanto a los triglicéridos plasmáticos, las hembras EP+DC de la cepa C57BL/6J presentaron una disminución del nivel de triglicéridos respecto del control, en cambio los machos BALB/c que también presentaron efectos debidos al EP mostraron un aumento de los triglicéridos (tanto al ingerir la dieta control o la DG). Además, los machos C57BL/6J y las hembras BALB/c presentaron un incremento en los niveles de triglicéridos debido al efecto conjunto de EP+DG. Panetta y colaboradores trabajando con ratas SD que fueron sometidas a estrés por restricción del movimiento y posteriormente alimentadas con una DG, no encontraron diferencias en los niveles de triglicéridos plasmáticos <sup>179</sup>. Sin embargo, en varios trabajos en donde a los animales se los somete a EP, ya sea por restricción del movimiento o por un modelo de estrés social, se ha reportado que los niveles de triglicéridos aumentan en las crías EP <sup>193,194</sup>. Otros autores han observado que este incremento de los triglicéridos se da solo en los machos EP, algo similar a lo observado por nosotros en los machos BALB/c <sup>187</sup>.

### **Tejido adiposo**

El tejido adiposo no es solamente un reservorio de energía, sino que también es un órgano endócrino. En la obesidad, se produce la inflamación del tejido adiposo, fenómeno que en la actualidad es reconocido como el primer paso para el desarrollo de IR <sup>107</sup>.

Al evaluar el peso del tejido adiposo abdominal como porcentaje del peso corporal, observamos que las hembras EP+DG C57BL/6J presentaron una disminución en este parámetro respecto al grupo control. Mientras que, al contrario, en los ratones de ambos sexos de la cepa BALB/c el peso del tejido adiposo aumentó por efecto conjunto del EP+DG.

En la literatura se encuentran resultados controversiales, por un lado se ha mostrado en ratas SD que la combinación de EP (por administración de GCs exógenos) y el consumo de una DG produce el desarrollo de obesidad y lleva al aumento del tejido adiposo <sup>77</sup>, resultados similares se observaron en la misma cepa, cuando se aplicó un paradigma de estrés variable <sup>76</sup>. En cambio, cuando el EP fue psicológico o por restricción, algunos estudios mostraron que hay una reducción en el peso corporal y la adiposidad <sup>195,196</sup> mientras que otros observaron que la restricción del movimiento no produce ningún tipo de cambio en este fenotipo <sup>197</sup>.

Por este motivo nos interesó medir la expresión de citoquinas proinflamatorias en este tejido. En cuanto a la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ , observamos que el estrés en conjunto con la ingesta de la DG disminuyó la expresión de este gen en los machos C57BL/6J respecto de los NEP alimentados con la misma dieta, esto podría proponerse como un efecto protector ejercido por el EP sobre los efectos de la dieta, dado que los ratones no estresados pero alimentados con esta dieta mostraron como era de esperar un incremento en la expresión de esta citoquina inflamatoria. En los machos EP de la cepa BALB/c alimentados con DC, se observó un aumento de la expresión de esta citoquina. Lo que en este caso nos estaría mostrando un efecto diferente del EP entre ambas cepas: en los C57BL/6J parece tener un rol protector sobre los efectos de la dieta, mientras que en los BALB/c tendría un efecto pernicioso produciendo inflamación sin necesidad de la ingesta de DG, sin embargo, este efecto no empeora por la ingesta de la dieta.

En un trabajo realizado en ratas, se observó que las crías macho que fueron EP presentaron niveles elevados de esta citoquina algo que coincide con nuestras observaciones en los ratones machos EP BALB/c <sup>198</sup>. Debe tenerse en cuenta que, según lo descrito en la bibliografía este aumento de la expresión de IL-1 $\beta$  no viene dado por la secreción por parte de los adipocitos, sino por el aumento de los macrófagos infiltrantes en el tejido adiposo los cuales tienen un perfil de macrófago M1, es decir, proinflamatorio y secretan las citoquinas

proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6<sup>103</sup>. En nuestro caso no podemos evaluar el grado de infiltración del mismo ya que no realizamos ningún análisis histológico del tejido adiposo.

TNF- $\alpha$  muestra un perfil de expresión similar al observado en IL-1 $\beta$  en los ratones macho C57BL/6J alimentados con DG. Una vez más mostrando algún tipo de efecto protector por parte del EP ante la inflamación causada por la ingesta de una DG. Un trabajo reciente de Tsai y colaboradores<sup>77</sup>, donde se administra GCs a madres gestantes y luego se alimenta a la crías con una DG reportó que hubo un incremento de TNF- $\alpha$  plasmático debido a la ingesta de la DG, pero no observaron efectos debidos al tratamiento prenatal. Estos autores además midieron la expresión de receptores tipo 1 y 2 de TNF- $\alpha$  en tejido adiposo y, encontraron que a pesar de que la cantidad de proteína circulante no está aumentada por el EP, si había un incremento de la expresión de dichos receptores.

En cuanto a las adipoquinas, como ya se mencionó, leptina y resistina se encuentran relacionadas con un aumento de la cantidad de células y del tamaño del tejido adiposo y, como es lógico, con un aumento del peso corporal o del contenido de tejido adiposo de un individuo. Entonces, su concentración plasmática se encuentra directamente relacionada al IMC del individuo. Además, ambas están implicadas en el desarrollo de IR. En cambio, adiponectina cumple el rol contrario, es una hormona sensibilizadora de los efectos de la insulina, que en condiciones normales presenta niveles circulantes inversamente proporcionales al IMC.

Teniendo en cuenta este marco teórico, esperaríamos encontrar un incremento de la expresión de leptina y resistina en los animales que aumentaron de peso o que presentaron un mayor contenido de masa grasa ya sea por la ingesta de la DG, por el EP o por la acción conjunta de ambos factores. Esto se observó únicamente en las hembras EP C57BL/6J que, como vimos anteriormente, presentaron un menor contenido de grasa corporal debido a la exposición a EP. Estos animales a pesar de no haber mostrado alteraciones en el peso corporal, presentaron una menor expresión de leptina y resistina, aunque sorprendentemente esto también estuvo acompañado por una disminución de la expresión de adiponectina. Esta disminución en adiponectina no estuvo acompañada por alteraciones en la respuesta a la glucosa ni a la sensibilidad a insulina, por lo que tal vez este hallazgo no tenga importancia fisiológica.

Cuando las hembras EP de esta cepa además ingirieron la DG mostraron una expresión notoriamente incrementada de leptina, sin alteraciones en la expresión de resistina ni adiponectina y, sin aumento del peso corporal, aunque con un aumento del contenido de grasa (debido a la ingesta de la dieta, sin la presencia de una interacción con el EP). Las hembras EP BALB/c presentaron una disminución en la expresión de leptina, sin alteraciones en la expresión de adiponectina y con un aumento de la expresión de resistina, pero sin ninguna aparente alteración fisiológica relacionada. Cuando estos animales consumieron la DG, como ya habíamos comentado, presentaron un importante aumento de peso corporal y del contenido de grasa corporal, lo que estuvo acompañado con la disminución en la expresión de adiponectina, y guardó relación con un aumento de glucemia a los 60 minutos post inyección observados en el test de sensibilidad a la insulina. Los machos BALB/c presentaron una disminución de la expresión de adiponectina debida al EP, sin mostrar alteraciones en la expresión de las demás adipoquinas, estos animales a pesar de haber presentado un mayor peso corporal desde el momento del destete no mostraron un mayor contenido de masa grasa, ni señales relacionadas a la intolerancia a la glucosa o la IR.

Sólo dos trabajos miden la expresión génica de leptina en un modelo de EP por administración de GCs, seguida por la ingesta de una DG. El primero evaluó la expresión de este gen en el hígado de los animales y observó que el efecto conjunto del EP+DG disminuía la expresión de leptina <sup>199</sup>. El segundo trabajo <sup>77</sup> evaluó la expresión en tejido adiposo retroperitoneal y observó que el tratamiento con GCs produjo una disminución de la expresión de leptina, algo similar a lo que nosotros encontramos para las hembras de ambas cepas. Numerosos trabajos miden la concentración de leptina plasmática, luego de la exposición a distintos tipos de EP y posterior ingesta de DG, la mayoría reporta que sólo la ingesta de la dieta produce un aumento de la leptina plasmática <sup>76,77,179,185</sup>. En otros, los autores han reportado que el EP no produjo ninguna alteración en la concentración de leptina circulante <sup>200</sup> o bien, produjo un aumento de la misma <sup>201</sup> o una disminución <sup>42</sup>. Sólo uno de estos trabajos midió además otra adipoquina en circulación, en este caso adiponectina, que al igual que leptina presentó un aumento debido a la ingesta de la DG y no se vio afectada por el estrés <sup>179</sup>.

En otro tipo de modelo de EP como es la fragmentación del sueño, se observó que crías macho expuestas a este tipo de estrés presentaron una menor expresión de adiponectina en el tejido adiposo visceral, lo que estuvo

acompañado por un mayor peso corporal, mayor ingesta de alimento e IR <sup>104</sup>. Teniendo en cuenta las disparidades encontradas en la bibliografía en cuanto los niveles de adipoquinas y la poca cantidad de trabajos que miden su expresión génica en tejido adiposo, nos proponemos en el futuro medir estas adipoquinas en circulación ya que como es ampliamente conocido la expresión génica en un tejido no siempre guarda relación lineal con la cantidad de esa proteína en el tejido o incluso en circulación.

En cuanto a la expresión de genes relacionados al metabolismo energético (FOXO1 y PPAR- $\gamma$ ) observamos pocas alteraciones causadas por el EP: para el caso de FOXO1 obtuvimos que los machos EP BALB/c presentaron una menor expresión de este gen en el tejido adiposo, mientras que PPAR- $\gamma$  presentó un incremento en su expresión debido al EP en los machos C57BL/6J. Recordemos que en el tejido adiposo FOXO1 regula la diferenciación de los adipocitos y es un mediador a nivel transcripcional de los efectos de la insulina. Además es regulado por GCs y se ha observado que aumenta la inflamación <sup>202</sup>. Existen diversos trabajos que han sugerido que la activación de FOXO1 contribuye a la muerte celular inducida por GCs de las células  $\beta$  pancreáticas <sup>203</sup>. En un estudio realizado recientemente por Cattaneo y colaboradores <sup>204</sup> se observó que FOXO1 es uno de los genes clave en la interacción entre genes y medio ambiente. Estos investigadores observaron que FOXO1 se encuentra asociado con alteraciones psicológicas en individuos expuestos a traumas durante la infancia, incluso se observaron que 6 polimorfismos de nucleótido único (SNPs) de este gen estaban estrechamente relacionados a la predicción de depresión durante la adultez.

En cuanto a la expresión de PPAR- $\gamma$ , algunos autores han registrado efectos contrarios a los que nosotros observamos, reportando una disminución de la expresión debida al tratamiento prenatal con GCs, sin embargo, en dicho trabajo la expresión de este gen se midió en el tejido adiposo retroperitoneal <sup>77</sup>. En otro modelo de EP, por exposición de la madre gestante a una hembra lactante agresiva, se encontró que los machos expuestos presentaron niveles de expresión de PPAR- $\gamma$  hepáticos más bajos, sin que estos llegaran a ser significativos <sup>187</sup>.

La expresión de SIRT1 aumenta durante la restricción calórica y esto se relaciona con una mejora en la sensibilidad a la insulina, disminuyendo la absorción de colesterol y reduciendo el almacenamiento lipídico <sup>128</sup>. En el



presente experimento no encontramos alteraciones de la expresión de este gen debidas al EP o a la interacción EP+DG. Tsai y colaboradores evaluaron la cantidad de SIRT1 por western blott en crías de ratas tratadas prenatalmente con GCs y, luego expuestas a una DG. Los autores observaron que los niveles proteicos de SIRT1 disminuyeron por el consumo de la DG pero no se vieron alterados por el tratamiento prenatal ni por la suma de ambos factores <sup>77</sup>. No hemos encontrado en la bibliografía otros trabajos que midan SIRT1 en tejido adiposo en modelos animales de EP. Como se discutirá más adelante, algunos trabajos realizan esta determinación en el hígado utilizando otros modelos de programación fetal.

## Hígado

La obesidad está asociada al desarrollo de esteatosis hepática o hígado graso, esta enfermedad está estrechamente relacionada con el desarrollo de IR <sup>205,206</sup> y, se debe principalmente, a un aumento del almacenamiento de lípidos por parte del hígado.

Debido a la IR, la glucosa no es ingresada a los hepatocitos y, en consecuencia, no se almacena como glucógeno. Entonces, existe una constante producción de glucosa que contribuye al estado de hiperglucemia. El hígado obeso también está caracterizado por la inflamación y la secreción de citoquinas inflamatorias. Los macrófagos residentes en el hígado denominados células de Kupffer juegan un rol esencial en este proceso y, se cree que cambian a un perfil de macrófago proinflamatorio. Bajo condiciones de inflamación excesiva, el hepatocito puede entrar en apoptosis, resultando en un reclutamiento mayor de células del sistema inmune, una inflamación progresiva y el desarrollo de esteatohepatitis

<sup>207</sup>.

Al evaluar el peso bruto del hígado, observamos que, al igual que lo que paso con el peso corporal, las hembras BALB/c y los machos de ambas cepas del grupo EP+DG presentaron un incremento en el peso de este tejido. Cuando este valor se relativiza al peso corporal, el incremento observado para las hembras y machos BALB/c se pierde por el efecto del mayor peso corporal antes mencionado, mientras que en los machos EP+DG C57BL/6J se sigue observando que el peso relativo del hígado es mayor que en los demás grupos, mostrando un efecto conjunto de EP y dieta. El aumento del peso del tejido probablemente

se deba a una mayor acumulación de lípidos en el mismo por efecto de la DG, que posiblemente sea más pronunciada en el grupo EP+DG, sin embargo, en el presente trabajo no evaluamos el hígado a nivel histológico como para poder asegurar esto. Los ratones de la cepa C57BL/6J alimentados con una DG constituyen uno de los modelos más utilizados para el estudio de un hígado graso de etiología no alcohólica <sup>208</sup>. Se ha observado que el tratamiento prenatal con GCs de ratas de la cepa SD produce que sus crías presenten mayor peso del hígado bruto y relativizado al peso corporal, aunque ante la ingesta de una DG, estas alteraciones no se vieron exacerbadas <sup>209</sup>.

En el hígado evaluamos el estado inflamatorio mediante la expresión de las citoquinas IL-1 $\beta$  (proinflamatoria) e IL-4 (antiinflamatoria). Observamos que la IL-1 $\beta$  aumentó en los machos C57BL/6J debido al efecto combinado del EP y la DG, en las hembras BALB/c también aumentó, pero debido al efecto del EP solamente. Al contrario de los que se observó en los machos de esta cepa en donde la expresión de IL-1 $\beta$  se encontró disminuida por el EP. En favor de nuestras observaciones, del incremento de la expresión de IL-1 $\beta$ , Tsai y colaboradores <sup>210</sup> han reportado un aumento de la expresión y síntesis de otra citoquina proinflamatoria, TNF- $\alpha$ , por el tratamiento prenatal con GCs. La disminución de la expresión de este gen observada en los machos BALB/c no ha sido reportada en la bibliografía como tampoco para otros genes proinflamatorios como TNF- $\alpha$  o IL-6. Podría postularse que el EP está ejerciendo de algún modo un efecto protector, sobre los machos de esta cepa ya que tampoco observamos que aumente la expresión por la ingesta de la DG en ninguno de los sexos de la cepa BALB/c.

En cuanto a la citoquina antiinflamatoria IL-4 observamos que su expresión aumenta significativamente en las hembras EP+DG BALB/c. En otro modelo de estrés gestacional como es la exposición materna a estrés social y emocional, se observó en que las crías expuestas a EP, cuando fueron alimentadas con la combinación de una dieta rica en sacarosa y en grasas, aumentaba en un 99% la expresión de una citoquina antiinflamatoria, IL-8, en el hígado de los animales <sup>198</sup>. Estos resultados, concuerdan con nuestras observaciones en las hembras BALBA EP+DG.

Al evaluar la expresión total de PGC1- $\alpha$ , observamos que disminuye debido al tratamiento prenatal recibido en los machos de ambas cepas. Cuando sólo se evaluó la expresión de la isoforma A de este coactivador, los resultados fueron similares para el caso de los machos C57BL/6J mientras que en los BALB/c no se observaron diferencias significativas. Se ha reportado que los niveles de expresión de PGC1- $\alpha$  disminuyen considerablemente, en ambos sexos, en un modelo de EP usando un paradigma de estrés social <sup>187</sup>. Otros autores han reportado que el EP por administración de GCs produce un aumento de la cantidad de proteína de PGC1- $\alpha$ , mientras que el efecto conjunto del EP y la ingesta de una DG produce una disminución de los niveles de esta proteína <sup>199</sup>. En nuestro modelo no observamos alteraciones en la expresión de este gen debidas a la combinación de EP y DG.

Al evaluar estos resultados, debe tenerse en cuenta que se ha reportado que una disminución en la expresión de PGC1- $\alpha$  está asociada con la IR hepática en pacientes con DBT e hígado graso no alcohólico <sup>211-213</sup>. Distintos modelos animales, sugieren que reducciones fisiológicas de este coactivador interrumpen la vía de señalización de insulina en el hígado <sup>214,215</sup>, y ratones con una expresión disminuida de PGC1- $\alpha$  son más susceptibles a desarrollar esteatosis hepática e hipertrigliceridemia, ambos involucrados en la IR <sup>214,216,217</sup>.

Cuando evaluamos la expresión hepática de PPAR- $\alpha$  se vio disminuida solo por el efecto del EP en los machos C57BL/6J y en los machos BALB/c por el efecto conjunto del EP+DG. Contrariamente, las hembras EP+DG BALB/c presentaron un aumento de la expresión de este gen. En un estudio realizado en ratas SD que fueron EP, los autores observan que particularmente en los machos los niveles de expresión de PPAR- $\alpha$  en hígado disminuyen <sup>187</sup>. Tsai y colaboradores <sup>77</sup> evaluaron la expresión de PPAR- $\alpha$  en tejido adiposo retroperitoneal de machos tratados prenatalmente con GCs y luego alimentados con DG y, observaron que el tratamiento con GCs disminuyó la expresión de este gen, mientras que no observaron alteraciones por el tratamiento conjunto de GCs+DG. Se ha reportado que la restauración de la expresión de PPAR- $\alpha$  y su actividad, está relacionada con la disminución del daño hepático, la inflamación y la fibrosis. Recuperándose de esta manera, la función metabólica en las mitocondrias y en el retículo endoplásmico y, mejorando la hipertrigliceridemia <sup>218,219</sup>.

La expresión de SOCS3 aumenta debido al EP en las hembras C57BL/6J mientras que en los machos de la misma cepa y, en ambos sexos de la cepa BALB/c disminuye por el EP. De acuerdo a lo reportado en la bibliografía, la expresión de SOCS3 se ve aumentada por estados inflamatorios como obesidad, IR o ante la ingesta de una DG, esto se debe a que hay varias citoquinas que estimulan su expresión <sup>209,220-222</sup>. Teniendo en cuenta estos datos, nosotros esperábamos observar un aumento de la expresión de este gen en la mayoría de los grupos, sin embargo, solo observamos esto en las hembras C57BL/6J y como un efecto del EP. El efecto observado por la combinación de EP+DG fue el mismo en los demás grupos que mostraron alteraciones: la expresión de SOCS3 disminuyó. Se ha reportado que la depleción de SOCS3 en el hígado de ratones protege a los mismos del desarrollo de IR por la acción de TNF- $\alpha$ ; sin embargo, cuando estos animales son alimentados con una DG presentan una mejora en la sensibilidad a la insulina hepática, aunque desarrollan obesidad e IR <sup>223</sup>. Más aun, estos animales presentan un aumento de la lipogénesis hepática lo que exacerba no solo el desarrollo de hígado graso, sino también, la aparición de obesidad, inflamación e IR <sup>224</sup>.

La expresión de SIRT1 disminuyó significativamente debido al EP solo en los machos de la cepa C57BL/6J. Se ha reportado que la ablación de SIRT1, en el hígado, produce un aumento de la esteatosis hepática y un desarrollo tardío de obesidad <sup>225</sup>. En el mismo sentido, se ha observado que el aumento de la expresión de SIRT1 que ocurre durante la restricción calórica estimula mecanismos que como fin último mejoran el estado de IR <sup>226-229</sup>.

Cuando se evaluó la expresión de SIRT3, observamos que en los machos C57BL/6J la expresión disminuyó por efecto del EP. Se ha observado que crías de madres obesas presentan menor expresión hepática de este gen y, que esto se encuentra estrechamente relacionado con el desarrollo de obesidad y otras comorbilidades <sup>230</sup>. También se ha reportado que la alimentación con una DG produce una regulación negativa de SIRT3 <sup>146</sup>. Otras observaciones han demostrado que la obesidad produce una disminución de la actividad y estabilidad de SIRT3 <sup>231</sup>. Estas observaciones apoyan los resultados obtenidos en los ratones macho C57BL/6J, donde el EP disminuyó su expresión. Sin embargo, el efecto conjunto de EP y dieta aumenta la expresión de SIRT3 en las hembras C57BL/6J, resultado que se contrapone a lo encontrado en bibliografía. Entonces

para realmente confirmar este comportamiento creemos que son necesarios otros estudios sobre la proteína y no solo en su expresión.

### **Músculo esquelético**

En el musculo esquelético solo se pudo determinar la expresión de GLUT4, debido a que no encontramos niveles de expresión detectables en los demás genes que probamos (PGC1- $\alpha$  total, PGC1- $\alpha$  isoforma A, SIRT1, SOCS3, TFAM y PPAR $\gamma$ ). En las hembras BALB/c observamos un aumento en la expresión de GLUT4 dado por el EP, mientras que en los machos BALB/c produjo una disminución. Wyrwoll y colaboradores<sup>186</sup> observaron que crías de ratas tratadas con GCs durante la gestación, presentaban un aumento de la expresión de GLUT4, lo que coincide con los resultados que observamos en las hembras BALB/c en nuestro modelo de EP. En cambio, en modelos experimentales de pre-diabetes, DBT1 y DBT2 la expresión de este gen se ha encontrado disminuida<sup>232-234</sup>. Algunos autores han propuesto que las alteraciones de este gen observadas en la IR podrían deberse a la toxicidad producida por la hiperglucemia o los elevados niveles de ácidos grasos libres o, de TNF- $\alpha$  en suero, todos factores estrechamente asociados a la IR y, que podrían estar afectando la expresión de GLUT4<sup>235</sup>. Por otra parte, el efecto conjunto de EP+DG produjo un aumento en la expresión de este gen en las hembras BALB/c.

En cuanto a los grupos que presentaron una mayor expresión de GLUT4 debe tenerse en cuenta que, a pesar de que este efecto no ha sido reportado, podría tratarse de un aumento de la expresión compensatorio a un incremento en la inestabilidad del RNA mensajero o de la proteína y/o a algún problema en la vía de señalización que lleva a la translocación de esta proteína a la membrana plasmática. Todos estos efectos son indetectables al medir el contenido de RNAm.

Por último, en la bibliografía se encuentran frecuentemente reportadas diferencias entre sexos en un amplio rango de modelos de programación fetal, realizados tanto en ratas como en ratones<sup>236</sup>. Por ejemplo, se ha reportado que los machos son más susceptibles al desarrollo de hipertensión en modelos de programación fetal, este efecto se ha observado en ratas en una amplia gama de

intervenciones incluyendo la administración prenatal de GCs <sup>237,238</sup>. La variación de resultados obtenidos entre los sexos, muestran una vez más la amplia disparidad entre ambos, no solo ante la ingesta de la DG sino también ante un mismo insulto sufrido durante el desarrollo prenatal, lo que sugiere que el dimorfismo sexual ante estas enfermedades debe ser estudiado con mayor profundidad.

**CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Cepa	C57BL/6J						BALB/c					
	HEMBRAS			MACHOS			HEMBRAS			MACHOS		
Tratamiento	EP+DC	NEP+DG	EP+DG	EP+DC	NEP+DG	EP+DG	EP+DC	NEP+DG	EP+DG	EP+DC	NEP+DG	EP+DG
Peso al destete	=	NA	NA	=	NA	NA	↑↑↑#	NA	NA	↑↑↑#	NA	NA
Curva de peso corporal	=	↓↓↓* (sem 4)	↑↑*(sem 20-28) ↑#(sem28)	=	↑↑*(sem 24-28)	↑↑*(sem 16-28) ↑#(sem 4, 16-24)	=	↑*(sem 28)	↑↑↑*(sem 12-28) ↑#(sem 4-28)	↑↑↑# (sem 4-20)	↑*(sem 8-28)	↑*(sem 16-28) ↑↑#(sem 4-28)
Peso del hígado	=	=	↓↓↓*	=	↓*	↑↑↑*#	=	↓↓↓*	=	=	↓↓↓*	↓↓↓* ↓#
Peso del TA	↓↓↓#	↑↑↑*	↑↑↑*	=	↑↑↑*	↑↑↑*	=	↑↑↑*	↑↑↑* #	=	↑↑↑*	↑↑↑* ↑#
TTG	=	=	=	=	↑↑↑* (30'-120')	↑↑↑* (30'-120')	=	=	=	=	=	=
TSI	=	↓↓↓* (30'-60')	↑# (15'-60')	↑↑↑# (30' - 60')	=	↑* (15') ↑↑↑# (30'-60')	=	=	↑↑* (60') ↑# (60')	=	↑* (60')	↑↑*(60')
Insulina plasmática	=	↓↓↓*	↓↓↓*	=	↑↑↑*	↑↑↑* ↑#	=	=	↑↑↑*	=	↑↑↑*	↑↑↑*
Colesterol total	=	=	↑↑↑*	=	↑↑↑*	↑↑↑*	=	↑↑↑*	↑* ↓#	↑↑↑#	↑↑↑*	↑↑↑* ↑↑↑#
Triglicéridos	↓↓↓↓#	=	=	=	=	↑↑↑* ↑↑↑#	=	↓↓↓*	↑* ↑↑↑#	↑↑↑#	=	↑↑↑#

Tabla 4: Resumen de resultados de la parte fisiológica.



	Cepa	C57BL/6J						BALB/c					
	Sexo	HEMBRAS			MACHOS			HEMBRAS			MACHOS		
	Tratamiento	EP+DC	NEP+DG	EP+DG	EP+DC	NEP+DG	EP+DG	EP+DC	NEP+DG	EP+DG	EP+DC	NEP+DG	EP+DG
Tejido adiposo	IL-1 $\beta$	=	=	↑*	=	↑↑*	↓↓↓#	=	=	=	↑#	↑↑*	↑*
	TNF- $\alpha$	=	=	↑↑*	=	↑*	↓#	=	=	=	=	=	↑↑*
	Leptina	↓↓↓#	↑↑*	↑↑↑* ↑↑#	=	↑*	=	↓#	=	↑↑↑*	=	↑↑↑*	↑↑*
	Adiponectina	↓↓#	=	↑*	=	↓↓*	↓↓↓*	=	=	↓↓↓* ↓↓↓#	↓↓#	↓↓*	=
	Resistina	↓#	=	↑↑*	=	=	=	↑#	=	=	=	↑↑↑*	↑↑↑*
	FOXO1	=	=	=	=	=	↓↓*	=	=	=	↓#	=	=
	PPAR $\gamma$	=	=	=	↑#	=	↓*	=	=	↓↓*	=	=	=
	SIRT1	=	=	=	=	↓↓*	=	=	=	=	=	=	=
Hígado	IL-1 $\beta$	=	↑↑↑*	↑↑*	=	=	↑↑↑* ↑↑#	↑#	=	=	↓#	=	=
	IL-4	=	=	=	=	↑↑*	↑↑↑*	=	↓↓↓*	↑#	=	=	=
	PGC1- $\alpha$	=	=	=	↓↓#	↓*	=	=	=	↓↓↓*	↓#	↓↓↓*	=
	PGC1- $\alpha$ IsoA	=	=	=	↓↓#	↓*	=	=	↓*	↓↓↓*	=	↓↓*	↓*
	PPAR $\alpha$	=	=	=	↓#	=	=	=	↑↑*	↑↑↑* ↑#	=	=	↓#
	SOCS3	↑#	=	=	↓#	=	↓↓#	↓↓#	↓*	↓#	↓↓↓#	↓↓↓*	=
	SIRT1	=	↓↓*	↓↓↓*	↓↓#	=	↓↓#	=	=	=	=	=	=
SIRT3	=	↓*	↑#	↓#	=	=	=	↑↑*	=	=	↑*	=	
Múculo esquelético	GLUT4	=	↑↑*	=	=	=	↑*	↑↑#	=	↑#	↓#	↓*	=

Tabla 5: Resumen de resultados de la parte molecular.

**Hembras C57BL/6J*****Efectos del EP:***

- una menor acumulación de masa grasa
- menor concentración plasmática de triglicéridos
- menor expresión de leptina y resistina en este tejido adiposo

Estos resultados sugieren que el EP tendría un efecto benéfico respecto al desarrollo de obesidad.

***Efectos del EP desenmascarados por el consumo de DG:***

- aumento del peso corporal
- menor respuesta a la insulina
- incremento de la inflamación y de la expresión de leptina, resistina y adiponectina en el tejido adiposo
- aumento de la expresión de SIRT3 hepática

En líneas generales, estos resultados indican que la DG sobre los animales EP induce alteraciones deletéreas, que el organismo trata de compensar mediante el incremento de la expresión de SIRT3 y adiponectina.

**Machos C57BL/6J*****Efectos del EP:***

- alteración en el test de sensibilidad a la insulina
- disminución de la expresión de PGC1- $\alpha$  (tanto total como la isoforma A), PPAR- $\alpha$ , SIRT1 y 3 hepáticas

Estas observaciones están relacionadas con el desarrollo de esteatosis hepática, menor sensibilidad a la insulina en ese órgano y el consecuente desarrollo de IR.

***Efectos del EP desenmascarados por el consumo de DG:***

- aumento del peso corporal de los animales
- mayor peso del hígado
- aumento de la insulina plasmática y de los triglicéridos
- aumento de la expresión hepática de IL-1 $\beta$
- disminución de la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  respecto de los NEP+DG, en el tejido adiposo
- disminución de la expresión de FOXO1 y PPAR- $\gamma$  en tejido adiposo

Todas estas observaciones sugieren el desarrollo de esteatosis hepática inducida por EP y dieta. Las alteraciones observadas en el tejido adiposo están relacionados con el desarrollo de intolerancia a la glucosa y menor sensibilidad a la insulina. Sin embargo, la disminución de la expresión de los genes inflamatorios podría proponerse como un efecto compensatorio del EP a la inflamación inducida por la ingesta de DG.

### **Hembras BALB/c**

#### *Efectos del EP:*

- disminución de la expresión de leptina y aumento de resistina en el tejido adiposo
- aumento de la expresión de IL-1 $\beta$  y disminución de SOCS3 en el hígado

El EP no ocasiona grandes cambios metabólicos en estos animales ya que a nivel fisiológico no se observaron alteraciones y, a nivel molecular, el cambio en la expresión génica tampoco es indicativo de un desbalance metabólico.

#### *Efectos del EP desenmascarados por el consumo de DG:*

- importante aumento del peso corporal
- aumento del peso del hígado y del peso relativo del tejido adiposo
- disminución de la respuesta a la insulina
- aumento de la insulina plasmática
- aumento de los triglicéridos plasmáticos
- disminución de adiponectina y PPAR- $\gamma$  en tejido adiposo
- aumento de la expresión de leptina en tejido adiposo
- disminución de la expresión de PGC1- $\alpha$  y aumento de PPAR- $\alpha$  en el hígado

Todas estas alteraciones son nocivas para el organismo ya que nos están indicando el desarrollo de obesidad con mayor depósito de masa grasa, aumento del tamaño del hígado y desarrollo de IR. La disminución de PGC1- $\alpha$  está relacionada con un aumento de la esteatosis hepática, estrechamente relacionada con el incremento de insulina y leptina y, la disminución de adiponectina y PPAR- $\gamma$ . Todos estos resultados son indicadores del desarrollo de IR y leptino-resistencia.

**Machos BALB/c***Efectos del EP:*

- aumento del peso corporal
- aumento del colesterol y los triglicéridos plasmáticos
- aumento de la expresión de IL-1 $\beta$ , disminución de adiponectina y FOXO1 en el tejido adiposo

Todas estas observaciones están relacionadas con el desarrollo de IR.

*Efectos del EP desenmascarados por el consumo de DG:*

- aumento del peso corporal
- aumento del peso relativo del tejido adiposo
- aumento del colesterol total
- aumento de la expresión de TNF- $\alpha$  en tejido adiposo
- disminución de la expresión hepática de PPAR- $\alpha$

El aumento del peso corporal observado en estos animales es compatible con el aumento del estado inflamatorio observado en el tejido adiposo. Sin embargo, el consumo de la DG no agravó los efectos ya observados en los animales EP.

Durante todo el trabajo se observó un claro dimorfismo sexual, además de las diferencias por el "background" genético de cada cepa frente al EP y la dieta. Todas estas observaciones, nos permiten concluir que el EP ejerce un efecto deletéreo a nivel metabólico sobre el organismo, que se evidencia en distinta medida (según la cepa y el sexo) frente a la ingesta de una dieta rica en grasa.

Consideramos que estos resultados son alentadores para continuar investigando en mayor detalle este modelo, con el fin de identificar cambios epigenéticos, para obtener marcadores moleculares que permitan predecir las alteraciones metabólicas observadas en la edad adulta. Esto puede ser de utilidad para tomar medidas que ayuden a prevenir el desarrollo de estas alteraciones en el futuro.

# BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

1. Tsigos C, Kyrrou I, Kassi E, Chrousos GP. *Stress, Endocrine Physiology and Pathophysiology*. MDText.com, Inc.; 2000.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905226>. Accessed March 7, 2019.
2. McEwen BS, Wingfield JC. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav*. 2003;43(1):2-15.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12614627>. Accessed March 7, 2019.
3. Doom JR, Gunnar MR. Stress physiology and developmental psychopathology: Past, present, and future. *Dev Psychopathol*. 2013;25(4pt2):1359-1373. doi:10.1017/S0954579413000667
4. Watson IPB, Brüne M, Bradley AJ. The evolution of the molecular response to stress and its relevance to trauma and stressor-related disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;68:134-147.  
doi:10.1016/j.neubiorev.2016.05.010
5. McEwen B. Allostasis and Allostatic Load Implications for Neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology*. 2000;22(2):108-124.  
doi:10.1016/S0893-133X(99)00129-3
6. McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*. 2007;87(3):873-904.  
doi:10.1152/physrev.00041.2006
7. Caspi A, Moffitt TE. Gene–environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(7):583-590.  
doi:10.1038/nrn1925
8. Reiche EMV, Nunes SOV, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol*. 2004;5(10):617-625. doi:10.1016/S1470-2045(04)01597-9
9. Hemmingsson E. A new model of the role of psychological and emotional distress in promoting obesity: conceptual review with implications for treatment and prevention. *Obes Rev*. 2014;15(9):769-779.  
doi:10.1111/obr.12197
10. Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(6):397-409.  
doi:10.1038/nrn2647
11. de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(6):463-475. doi:10.1038/nrn1683
12. Moisiadis VG, Matthews SG. Glucocorticoids and fetal programming part 1: outcomes. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(7):391-402.  
doi:10.1038/nrendo.2014.73
13. Lightman SL, Conway-Campbell BL. The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nat Rev Neurosci*.

- 2010;11(10):710-718. doi:10.1038/nrn2914
14. Pecoraro N, Dallman MF. Hypothalamic–Pituitary–Adrenal (HPA) Axis. In: *Encyclopedia of Neuroscience*. Elsevier; 2009:65-74. doi:10.1016/B978-008045046-9.00474-5
  15. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocr Rev*. 2000;21(1):55-89. doi:10.1210/edrv.21.1.0389
  16. Zhu L-J, Liu M-Y, Li H, et al. The different roles of glucocorticoids in the hippocampus and hypothalamus in chronic stress-induced HPA axis hyperactivity. Homberg J, ed. *PLoS One*. 2014;9(5):e97689. doi:10.1371/journal.pone.0097689
  17. de Kloet ER, de Kloet SF, de Kloet CS, de Kloet AD. Top-down and bottom-up control of stress-coping. *J Neuroendocrinol*. 2019;(October 2018):1-16. doi:10.1111/jne.12675
  18. Green MK, Rani CSS, Joshi A, et al. Prenatal stress induces long term stress vulnerability, compromising stress response systems in the brain and impairing extinction of conditioned fear after adult stress. *Neuroscience*. 2011;192:438-451. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.041
  19. Huizink AC, Mulder EJH, Buitelaar JK. Prenatal Stress and Risk for Psychopathology: Specific Effects or Induction of General Susceptibility? *Psychol Bull*. 2004;130(1):115-142. doi:10.1037/0033-2909.130.1.115
  20. Jarvis S, Moinard C, Robson SK, et al. Programming the offspring of the pig by prenatal social stress: neuroendocrine activity and behaviour. *Horm Behav*. 2006;49(1):68-80. doi:10.1016/j.yhbeh.2005.05.004
  21. Otten W, Kanitz E, Couret D, Veissier I, Prunier A, Merlot E. Maternal social stress during late pregnancy affects hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain neurotransmitter systems in pig offspring. *Domest Anim Endocrinol*. 2010;38(3):146-156. doi:10.1016/j.domaniend.2009.09.002
  22. Palermo Neto J, Massoco CO, Fávare RC. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Neurotoxicol Teratol*. 2001;23(5):497-507. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11711253>. Accessed March 26, 2019.
  23. Merlot E, Couret D, Otten W. Prenatal stress, fetal imprinting and immunity. *Brain Behav Immun*. 2008;22(1):42-51. doi:10.1016/j.bbi.2007.05.007
  24. Chung S, Son GH, Park SH, et al. Differential adaptive responses to chronic stress of maternally stressed male mice offspring. *Endocrinology*. 2005;146(7):3202-3210. doi:10.1210/en.2004-1458
  25. Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C, Van Reeth O. Prenatal stress and long-term consequences: implications of

- glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev.* 2003;27(1-2):119-127. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12732228>. Accessed March 26, 2019.
26. Götz AA, Stefanski V. Psychosocial maternal stress during pregnancy affects serum corticosterone, blood immune parameters and anxiety behaviour in adult male rat offspring. *Physiol Behav.* 2007;90(1):108-115. doi:10.1016/j.physbeh.2006.09.014
  27. Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Intrauterine Programming of Physiological Systems: Causes and Consequences. *Physiology.* 2006;21(1):29-37. doi:10.1152/physiol.00050.2005
  28. Michelsen KA, van den Hove D LA, Schmitz C, Segers O, Prickaerts J, Steinbusch HW. Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress influence dendritic spine density and morphology in the rat medial prefrontal cortex. *BMC Neurosci.* 2007;8(1):107. doi:10.1186/1471-2202-8-107
  29. Weinstock M, Poltyrev T, Schorer-Apelbaum D, Men D, McCarty R. Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats. *Physiol Behav.* 1998;64(4):439-444. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9761216>. Accessed March 26, 2019.
  30. Klein SL, Rager DR. Prenatal stress alters immune function in the offspring of rats. *Dev Psychobiol.* 1995;28(6):321-336. doi:10.1002/dev.420280603
  31. Maccari S, Piazza P V, Kabbaj M, Barbazanges A, Simon H, Le Moal M. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J Neurosci.* 1995;15(1 Pt 1):110-116. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7823121>. Accessed March 26, 2019.
  32. Llorente E, Brito ML, Machado P, González MC. Effect of prenatal stress on the hormonal response to acute and chronic stress and on immune parameters in the offspring. *J Physiol Biochem.* 2002;58(3):143-149. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12603008>. Accessed March 26, 2019.
  33. Krozowski Z, Li KXZ, Koyama K, et al. The type I and type II 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999;69(1-6):391-401. doi:10.1016/S0960-0760(99)00074-6
  34. Tomlinson JW, Stewart PM. Cortisol metabolism and the role of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2001;15(1):61-78. doi:10.1053/beem.2000.0119
  35. Cottrell EC, Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and the programming of adult disease. *Front Behav Neurosci.* 2009;3:1-9. doi:10.1017/CBO9780511545658.007
  36. Edwards C, Benediktsson R, Lindsay R, Seckl J. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult



- hypertension? *Lancet*. 1993;341:355-357.
37. Lindsay RS, Lindsay RM, Waddell BJ, Seckl JR. Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia*. 1996;39(11):1299-1305. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8932995>. Accessed March 7, 2019.
  38. Langley-Evans SC. Maternal carbenoxolone treatment lowers birthweight and induces hypertension in the offspring of rats fed a protein-replete diet. *Clin Sci (Lond)*. 1997;93(5):423-429. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486087>. Accessed March 7, 2019.
  39. Welberg LA, Seckl JR, Holmes MC. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. *Eur J Neurosci*. 2000;12(3):1047-1054. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10762336>. Accessed March 7, 2019.
  40. Talge NM, Neal C, Glover V, Early Stress, Translational Research and Prevention Science Network: Fetal and Neonatal Experience on Child and Adolescent Mental Health. Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *J Child Psychol Psychiatry*. 2007;48(3-4):245-261. doi:10.1111/j.1469-7610.2006.01714.x
  41. Berkowitz GS, Wolff MS, Janevic TM, Holzman IR, Yehuda R, Landrigan PJ. The World Trade Center disaster and intrauterine growth restriction. *JAMA*. 2003;290(5):595-596. doi:10.1001/jama.290.5.595-b
  42. Lesage J, Del-Favero F, Leonhardt M, et al. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *J Endocrinol*. 2004;181(2):291-296. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15128277>. Accessed March 7, 2019.
  43. Boersma GJ, Tamashiro KL. Individual differences in the effects of prenatal stress exposure in rodents. *Neurobiol Stress*. 2015;1(1):100-108. doi:10.1016/j.ynstr.2014.10.006
  44. Brown AS, Susser ES, Lin SP, Neugebauer R, Gorman JM. Increased risk of affective disorders in males after second trimester prenatal exposure to the Dutch hunger winter of 1944-45. *Br J Psychiatry*. 1995;166(5):601-606. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7620744>. Accessed March 7, 2019.
  45. Watson JB, Mednick SA, Huttunen M, Wang X. Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. *Dev Psychopathol*. 1999;11(3):457-466. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10532619>. Accessed March 7, 2019.
  46. Morley-Fletcher S, Darnaudéry M, Mocaer E, et al. Chronic treatment with imipramine reverses immobility behaviour, hippocampal corticosteroid receptors and cortical 5-HT(1A) receptor mRNA in

- prenatally stressed rats. *Neuropharmacology*. 2004;47(6):841-847.  
doi:10.1016/j.neuropharm.2004.06.011
47. Lee PR, Brady DL, Shapiro RA, Dorsa DM, Koenig JI. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Res*. 2007;1156:152-167. doi:10.1016/j.brainres.2007.04.042
  48. Koenig JI, Elmer GI, Shepard PD, et al. Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. *Behav Brain Res*. 2005;156(2):251-261. doi:10.1016/j.bbr.2004.05.030
  49. Gudsnuik K, Champagne FA. Epigenetic Influence of Stress and the Social Environment. *ILAR J*. 2012;53(3-4):279-288. doi:10.1093/ilar.53.3-4.279
  50. Vanitallie TB. Stress: a risk factor for serious illness. *Metabolism*. 2002;51(6 Suppl 1):40-45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12040540>. Accessed March 7, 2019.
  51. Forsdahl a. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br J of Preventive Soc Med*. 1977;31:91-95.
  52. Barker DJP, Osmond C, Winter PD, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. 1989;334(8663):577-580. doi:10.1016/S0140-6736(89)90710-1
  53. Osmond C, Barker D, Winter P, Fall C, Simmonds S. Early growth and death from cardiovascular disease in women. *Br Med J*. 1993;307(6918):1519-1524.
  54. Barker DJP, Gluckman P, Godfrey K, Harding J, Owens J, Robinson J. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*. 1993;341(13):938-941. doi:10.1016/0140-6736(93)91224-A
  55. Barker D. *Mothers, Babies and Health in Later Life*. second edition. Edinburgh : Churchill Livingstone; 1998.  
<https://trove.nla.gov.au/work/7976056?q&versionId=45738878>. Accessed March 7, 2019.
  56. Luyckx VA, Bertram JF, Brenner BM, et al. Effect of fetal and child health on kidney development and long-term risk of hypertension and kidney disease. *Lancet*. 2013;382(9888):273-283. doi:10.1016/s0140-6736(13)60311-6
  57. Victora CG, Adair L, Fall C, et al. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet*. 2008;371(9609):340-357. doi:10.1016/S0140-6736(07)61692-4
  58. Andersen LG, Ångquist L, Eriksson JG, et al. Birth weight, childhood body mass index and risk of coronary heart disease in adults: Combined historical cohort studies. *PLoS One*. 2010;5(11):20-22.  
doi:10.1371/journal.pone.0014126
  59. Forsén T, Eriksson JG, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJP. Growth in utero and during childhood among women who develop coronary heart

- disease: longitudinal study. *Bmj*. 1999;319(7222):1403-1407.  
doi:10.1136/bmj.319.7222.1403
60. R. H, C.G. O, P.H. W, et al. Is birth weight a risk factor for ischemic heart disease in later life? *Am J Clin Nutr*. 2007;85(5):1244-1250.  
<http://www.ajcn.org/cgi/reprint/85/5/1244%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed8&NEWS=N&AN=2007235562>.
  61. Leon DA, Lithell HO, Vågerö D, et al. Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15 000 Swedish men and women born 1915-29. *Bmj*. 1998;317(7153):241-245.  
doi:10.1136/bmj.317.7153.241
  62. Stein C, Fall C, Kumaran K, Osmond C, Cox V, Barker D. Fetal growth and coronary heart disease. *Lancet*. 1996;348(9047):1269-1273.  
doi:10.1016/S0140-6736(05)64901-X
  63. Hales C, Barker D, Clark P, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *October*. 1991;303:1019-1022.
  64. Fall CHD, Osmond C, Barker DP, et al. Fetal and infant growth and cardiovascular risk factors in women. *Bmj*. 1995;310(6977):428-432.  
doi:10.1136/bmj.310.6977.428
  65. Phillips DIW. Relation of Fetal Growth to Adult Muscle Mass and Glucose Tolerance. *Diabet Med*. 1995;12(February):686-690.
  66. Franzek EJ, Sprangers N, Janssens ACJW, Van Duijn CM, Van De Wetering BJM. Prenatal exposure to the 1944-45 Dutch 'hunger winter' and addiction later in life. *Addiction*. 2008;103(3):433-438.  
doi:10.1111/j.1360-0443.2007.02084.x
  67. St.Clair D, Xu M, Wang P, et al. Rates of Adult Schizophrenia Following Prenatal Exposure to the Chinese Famine of 1959-1961. *JAMA*. 2005;294(5):557-562.
  68. Whincup PH, Kaye SJ, Owen CG, et al. Birth weight and risk of type 2 diabetes a systematic review. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2008;300(24):2886-2897.  
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L354041915;%5Cnhttp://jama.ama-assn.org/cgi/reprint/300/24/2886;%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1001/jama.2008.886;%5Cnhttp://sfxhosted.exlibrisgroup.com/dal?sid=EMBASE&issn=00987484&id=doi>.
  69. Huxley R, Neil A, Collins R. Unravelling the fetal origins hypothesis: is there really an inverse association between birthweight and subsequent blood pressure? *Lancet*. 2002;360:659-665.
  70. Huxley RR, Shiell AW, Law CM. The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *J Hypertens*. 2000;18(7):815-831.

- doi:10.1097/00004872-200018070-00002
71. Law C, Shiell A. Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature. *J Hypertens.* 1996;14:935-941.
  72. Moisiadis VG, Matthews SG. Glucocorticoids and fetal programming part 2: mechanisms. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(7):403-411.  
doi:10.1038/nrendo.2014.74
  73. Feil R. Environmental and nutritional effects on the epigenetic regulation of genes. *Mutat Res Mol Mech Mutagen.* 2006;600(1-2):46-57.  
doi:10.1016/j.mrfmmm.2006.05.029
  74. Cutfield WS, Hofman PL, Mitchell M, Morison IM. Could epigenetics play a role in the developmental origins of health and disease? *Pediatr Res.* 2007;61(5 PART 2 SUPPL.):68-75. doi:10.1203/pdr.0b013e318045764c
  75. Vickaryous N, Whitelaw E. The role of early embryonic environment on epigenotype and phenotype. *Reprod Fertil Dev.* 2005;17(3):335-340.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15745641>. Accessed April 10, 2019.
  76. Tamashiro K, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JI, Moran TH. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes.* 2009;58(5):1116-1125. doi:10.2337/db08-1129
  77. Tsai C-C, Tiao M-M, Sheen J-M, et al. Obesity programmed by prenatal dexamethasone and postnatal high-fat diet leads to distinct alterations in nutrition sensory signals and circadian-clock genes in visceral adipose tissue. *Lipids Health Dis.* 2019;18(1):19. doi:10.1186/s12944-019-0963-1
  78. Yu H-R, Tain Y-L, Tiao M-M, et al. Prenatal dexamethasone and postnatal high-fat diet have a synergistic effect of elevating blood pressure through a distinct programming mechanism of systemic and adipose renin-angiotensin systems. *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):50. doi:10.1186/s12944-018-0701-0
  79. Tain Y-L, Sheen J-M, Yu H-R, et al. Maternal Melatonin Therapy Rescues Prenatal Dexamethasone and Postnatal High-Fat Diet Induced Programmed Hypertension in Male Rat Offspring. *Front Physiol.* 2015;6:377. doi:10.3389/fphys.2015.00377
  80. Sheen JM, Hsieh CS, Tain YL, et al. Programming effects of prenatal glucocorticoid exposure with a postnatal high-fat diet in diabetes mellitus. *Int J Mol Sci.* 2016;17(4):1-12. doi:10.3390/ijms17040533
  81. Agarwal P, Morriveau TS, Kereliuk SM, Doucette CA, Wicklow BA, Dolinsky VW. Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2018;55(2):71-101. doi:10.1080/10408363.2017.1422109
  82. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988;37(12):1595-1607.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3056758>. Accessed March 27, 2019.
83. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486-2497. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11368702>. Accessed March 27, 2019.
  84. Metabolic Syndrome: A health crisis hiding in plain sight | Metabolic Syndrome Canada. <https://www.metabolicsyndromecanada.ca/about-metabolic-syndrome>. Published 2019. Accessed March 27, 2019.
  85. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20(2):12. doi:10.1007/s11906-018-0812-z
  86. Balkau B. Epidemiology of the metabolic syndrome and the RISC study. *Eur Hear J Suppl*. 2005;7(suppl\_D):D6-D9. doi:10.1093/eurheartj/sui022
  87. Isaac Sinay, José Costa Gil, Luís de Loredó, et al. *Consenso Latinoamericano de La Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD)*.; 2010. [www.idf.org/metabolic\\_syndrome\\_website](http://www.idf.org/metabolic_syndrome_website). Accessed March 27, 2019.
  88. Diaz A, Espeche W, March C, et al. Prevalencia del síndrome metabólico en Argentina en los últimos 25 años: revisión sistemática de estudios observacionales poblacionales. *Hipertens y Riesgo Vasc*. 2018;35(2):64-69. doi:10.1016/J.HIPERT.2017.08.003
  89. INDEC, Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación. Tercera encuesta nacional de factores de riesgo para enfermedades no transmisibles. 2015. [http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000544cnt-2015\\_09\\_04\\_encuesta\\_nacional\\_factores\\_riesgo.pdf](http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000544cnt-2015_09_04_encuesta_nacional_factores_riesgo.pdf). Accessed March 27, 2019.
  90. OMS | Obesidad. WHO. <https://www.who.int/topics/obesity/es/>. Published 2016. Accessed March 27, 2019.
  91. Más hambrientos y más obesos en América Latina en medio de la desigualdad | Noticias ONU. <https://news.un.org/es/story/2018/11/1445101>. Published 2018. Accessed March 27, 2019.
  92. Narkiewicz K. Obesity and hypertension—the issue is more complex than we thought. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(2):264-267. doi:10.1093/ndt/gfi290
  93. Krauss, Winston, Fletcher, Grundy. Obesity : impact on cardiovascular disease. *Circulation*. 1998;98(14):1472-1476. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9760304>. Accessed March 27, 2019.
  94. Cassidy AE, Bielak LF, Zhou Y, et al. Progression of subclinical coronary atherosclerosis: does obesity make a difference? *Circulation*. 2005;111(15):1877-1882. doi:10.1161/01.CIR.0000161820.40494.5D

95. Engeli S, Sharma A. Role of Adipose Tissue for Cardiovascular-Renal Regulation in Health and Disease. *Horm Metab Res.* 2000;32(11/12):485-499. doi:10.1055/s-2007-978675
96. Grundy SM. Metabolic syndrome update. *Trends Cardiovasc Med.* 2016;26(4):364-373. doi:10.1016/J.TCM.2015.10.004
97. Mayo Clinic Staff. *Triglycerides: Why Do They Matter?;* 2018. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/high-blood-cholesterol/in-depth/triglycerides/art-20048186>. Accessed March 27, 2019.
98. Samson SL, Garber AJ. Metabolic Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2014;43(1):1-23. doi:10.1016/j.ecl.2013.09.009
99. Könnner AC, Brüning JC. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab.* 2012;16(2):144-152. doi:10.1016/j.cmet.2012.07.004
100. Puttabyatappa M, Padmanabhan V. Prenatal testosterone programming of insulin resistance in the female sheep. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1043:575-596. doi:10.1007/978-3-319-70178-3\_25
101. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003;52(1):102-110. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12502499>. Accessed April 12, 2019.
102. Cristi-Montero C, Celis-Morales C, Ramírez-Campillo R, et al. *Diabetes Atlas de La FID.* Vol 8.; 2017. doi:10.1016/j.diabres.2017.09.002
103. McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM. Mechanisms of Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance: Insights into the Emerging Role of Nutritional Strategies. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4(May):1-23. doi:10.3389/fendo.2013.00052
104. Khalyfa A, Mutskov V, Carreras A, Khalyfa AA, Hakim F, Gozal D. Sleep fragmentation during late gestation induces metabolic perturbations and epigenetic changes in adiponectin gene expression in male adult offspring mice. *Diabetes.* 2014;63(10):3230-3241. doi:10.2337/db14-0202
105. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha : direct role in obesity linked insulin resistance. *Science (80- ).* 1993;259(January):87-91.
106. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med.* 2012;18(3):363-374. doi:10.1038/nm.2627
107. Stolarczyk E. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Curr Opin Pharmacol.* 2017;37:35-40. doi:10.1016/j.coph.2017.08.006
108. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF- $\alpha$  and adipocyte biology. *FEBS Lett.* 2008;582(1):117-131. doi:10.1016/J.FEBSLET.2007.11.051

109. Scotece M, Gómez R, Gonzalez-Gay MA, et al. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(2):100-109. doi:10.1038/nrrheum.2016.209
110. Kim AY, Park YJ, Pan X, et al. Obesity-induced DNA hypermethylation of the adiponectin gene mediates insulin resistance. *Nat Commun*. 2015;6(May):1-11. doi:10.1038/ncomms8585
111. Nawrocki AR, Ruderman NB, Scherer PE, et al. Mice Lacking Adiponectin Show Decreased Hepatic Insulin Sensitivity and Reduced Responsiveness to Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Agonists. *J Biol Chem*. 2005;281(5):2654-2660. doi:10.1074/jbc.m505311200
112. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005;26(3):439-451. doi:10.1210/er.2005-0005
113. Mostafazadeh M, Haiaty S, Rastqar A, Keshvari M. Correlation Between Resistin Level and Metabolic Syndrome Component: A Review. *Horm Metab Res*. 2018;50(07):521-536. doi:10.1055/a-0637-1975
114. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409(6818):307. doi:10.1016/j.reuma.2008.12.003
115. Acquarone E, Monacelli F, Borghi R, Nencioni A, Odetti P. Resistin: A reappraisal. *Mech Ageing Dev*. 2019;178(August 2018):46-63. doi:10.1016/j.mad.2019.01.004
116. Steppan CM, Lazar MA. The current biology of resistin. *J Intern Med*. 2004;255(4):439-447. doi:10.1111/j.1365-2796.2004.01306.x
117. Lazar M. Resistin- and Obesity-associated Metabolic Diseases. *Horm Metab Res*. 2007;39(10):710-716. doi:10.1055/s-2007-985897
118. Owecki M, Miczke A, Nikisch E, Pupek-Musialik D, Sowiński J. Serum Resistin Concentrations are Higher in Human Obesity but Independent from Insulin Resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2011;119(02):117-121. doi:10.1055/s-0030-1263111
119. Moon B, Kwan JJ-M, Duddy N, Sweeney G, Begum N. Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. *Am J Physiol Metab*. 2003;285(1):E106-E115. doi:10.1152/ajpendo.00457.2002
120. Lee S, Dong HH. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism. *J Endocrinol*. 2017;233(2):1-21. doi:10.1530/JOE-17-0002.FoxO
121. Matsumoto M, Poci A, Rossetti L, Depinho RA, Accili D. Impaired Regulation of Hepatic Glucose Production in Mice Lacking the Forkhead Transcription Factor Foxo1 in Liver. *Cell Metab*. 2007;6(September):208-216. doi:10.1016/j.cmet.2007.08.006
122. Link W, Fernandez-marcos PJ. FOXO transcription factors at the interface of metabolism and cancer. *Int J cancer*. 2017;12:2379-239.
123. Nakae J, Cao Y, Oki M, et al. Forkhead Transcription Factor FoxO1 in

- Adipose Tissue Regulates Energy Storage and Expenditure. *Diabetes*. 2008;57(March):563-576. doi:10.2337/db07-0698. Additional
124. Pap A, Cuaranta-Monroy I, Peloquin M, Nagy L. Is the mouse a good model of human PPAR $\gamma$ -related metabolic diseases? *Int J Mol Sci*. 2016;17(8):1-22. doi:10.3390/ijms17081236
  125. Panunti B, Fonseca V. Effects of PPAR gamma agonists on cardiovascular function in obese, non-diabetic patients. *Vascul Pharmacol*. 2006;45(1):29-35. doi:10.1016/j.vph.2005.11.013
  126. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(4):860-867. doi:10.1097/MCO.0b013e32830460c2
  127. Bosch-Presegué L, Vaquero A. Sirtuin-dependent epigenetic regulation in the maintenance of genome integrity. *FEBS J*. 2014;282(9):1745-1767. doi:10.1111/febs.13053
  128. Brooks C. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nat Rev Cancer*. 2009;9(FEBRUARY):123-128. <http://www.nature.com/nrc/journal/v9/n2/abs/nrc2562.html>.
  129. Zhang H-H, Ma X-J, Wu L-N, et al. SIRT1 attenuates high glucose-induced insulin resistance via reducing mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. *Exp Biol Med*. 2015;240(5):557-565. doi:10.1177/1535370214557218
  130. Lantier L, Williams AS, Williams IM, et al. SIRT3 is crucial for maintaining skeletal muscle insulin action and protects against severe insulin resistance in high-fat-fed mice. *Diabetes*. 2015;64(9):3081-3092. doi:10.2337/db14-1810
  131. Jones JG. Hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia*. 2016;59(6):1098-1103. doi:10.1007/s00125-016-3940-5
  132. Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med*. 2016;48(3):e218-10. doi:10.1038/emm.2015.122
  133. Titchenell PM, Lazar MA, Birnbaum MJ. Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin. *Trends Endocrinol Metab*. 2017;28(7):497-505. doi:10.1016/j.tem.2017.03.003
  134. Kitade H, Chen G, Ni Y, Ota T. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments. *Nutrients*. 2017;9(4). doi:10.3390/NU9040387
  135. Lochmann TL, Thomas RR, Bennett JP, Taylor SM. Epigenetic modifications of the PGC-1 $\alpha$  promoter during exercise induced expression in mice. *PLoS One*. 2015;10(6):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0129647
  136. Herzig S, Long F, Jhala US, et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. 2001;413(September):179-183.
  137. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, et al. Control of hepatic gluconeogenesis



- through the transcriptional coactivator PGC-1. 2001:131-138.
138. Besse-Patin A, Jeromson S, Levesque-Damphousse P, Secco B, Laplante M, Estall JL. PGC1A regulates the IRS1:IRS2 ratio during fasting to influence hepatic metabolism downstream of insulin. *Proc Natl Acad Sci.* 2019;(2):201815150. doi:10.1073/pnas.1815150116
  139. Besseiche A, Riveline J-P, Gautier J-F, Bréant B, Blondeau B. Metabolic roles of PGC-1 $\alpha$  and its implications for type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2015;41(5):347-357. doi:10.1016/J.DIABET.2015.02.002
  140. Mirza AZ, Althagafi II, Shamshad H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *Eur J Med Chem.* 2019;166:502-513. doi:10.1016/j.ejmech.2019.01.067
  141. Galic S, Sachithanandan N, Kay TW, Steinberg GR. Suppressor of cytokine signalling (SOCS) proteins as guardians of inflammatory responses critical for regulating insulin sensitivity. *Biochem J.* 2014;461(2):177-188. doi:10.1042/bj20140143
  142. Ueki K, Kondo T, Tseng Y, Kahn CR. Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis , insulin resistance , and the metabolic syndrome in the mouse. 2004.
  143. Kincaid B, Bossy-Wetzel E. Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci.* 2013;5(SEP):1-13. doi:10.3389/fnagi.2013.00048
  144. Palacios OM, Carmona JJ, Michan S, et al. Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1 $\alpha$  in skeletal muscle. *Aging (Albany NY).* 2009;1(9):771-783. doi:10.18632/aging.100075
  145. Tauriainen E, Luostarinen M, Martonen E, et al. Distinct effects of calorie restriction and resveratrol on diet-induced obesity and fatty liver formation. *J Nutr Metab.* 2011;2011. doi:10.1155/2011/525094
  146. Hirschey MD, Shimazu T, Jing E, et al. Accelerate the Development of the Metabolic Syndrome. 2013;44(2):177-190. doi:10.1016/j.molcel.2011.07.019.SIRT3
  147. Lombard DB, Alt FW, Cheng H-L, et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol.* 2007;27(24):8807-8814. doi:10.1128/MCB.01636-07
  148. Morales PE, Bucarey JL, Espinosa A. Muscle Lipid Metabolism: Role of Lipid Droplets and Perilipins. *J Diabetes Res.* 2017;2017:1-10. doi:10.1155/2017/1789395
  149. Rüegg J, Cai W, Karimi M, et al. Epigenetic Regulation of Glucose Transporter 4 by Estrogen Receptor  $\beta$ . *Mol Endocrinol.* 2011;25(12):2017-2028. doi:10.1210/me.2011-1054
  150. Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(4):267-277.

- doi:10.1038/nrm782
151. Graham TE, Kahn BB. Tissue-specific alterations of glucose transport and molecular mechanisms of intertissue communication in obesity and type 2 diabetes. *Horm Metab Res.* 2007;39(10):717-721. doi:10.1055/s-2007-985879
  152. Sternberg EM, Glowa JR, Smith MA, et al. Corticotropin releasing hormone related behavioral and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats. *Brain Res.* 1992;570(1-2):54-60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1319794>. Accessed March 7, 2019.
  153. Stöhr T, Schulte Wermeling D, Szuran T, et al. Differential effects of prenatal stress in two inbred strains of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998;59(4):799-805. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9586834>. Accessed March 7, 2019.
  154. Bosch OJ, Krömer SA, Neumann ID. Prenatal stress: opposite effects on anxiety and hypothalamic expression of vasopressin and corticotropin-releasing hormone in rats selectively bred for high and low anxiety. *Eur J Neurosci.* 2006;23(2):541-551. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04576.x
  155. Bock J, Wainstock T, Braun K, Segal M. Stress In Utero: Prenatal Programming of Brain Plasticity and Cognition. *Biol Psychiatry.* 2015;78(5):315-326. doi:10.1016/j.biopsych.2015.02.036
  156. O'Connor TG, Barrett ES. Mechanisms of Prenatal Programming: Identifying and Distinguishing the Impact of Steroid Hormones. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:52. doi:10.3389/FENDO.2014.00052
  157. Mueller BR, Bale TL. Sex-Specific Programming of Offspring Emotionality after Stress Early in Pregnancy. *J Neurosci.* 2008;28(36):9055-9065. doi:10.1523/jneurosci.1424-08.2008
  158. Behan AT, van den Hove DLA, Mueller L, et al. Evidence of female-specific glial deficits in the hippocampus in a mouse model of prenatal stress. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2011;21(1):71-79. doi:10.1016/j.euroneuro.2010.07.004
  159. Schroeder M, Sultany T, Weller A. Prenatal stress effects on emotion regulation differ by genotype and sex in prepubertal rats. *Dev Psychobiol.* 2013;55(2):176-192. doi:10.1002/dev.21010
  160. Nishikawa S, Yasoshima A, Doi K, Nakayama H, Uetsuka K. Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice. *Exp Anim.* 2007;56(4):263-272. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17660680>. Accessed March 8, 2019.
  161. Palumbo ML, Canzobre MC, Pascuan CG, Ríos H, Wald M, Genaro AM. Stress induced cognitive deficit is differentially modulated in BALB/c and C57Bl/6 mice: correlation with Th1/Th2 balance after stress exposure. *J Neuroimmunol.* 2010;218(1-2):12-20. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.11.005
  162. Palumbo ML, Zorrilla Zubilete MA, Cremaschi GA, Genaro AM. Different effect of chronic stress on learning and memory in BALB/c and

- C57BL/6 inbred mice: Involvement of hippocampal NO production and PKC activity. *Stress*. 2009;12(4):350-361. doi:10.1080/10253890802506383
163. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939-1951. doi:10.1093/jn/123.11.1939
  164. McGuinness OP, Ayala JE, Laughlin MR, Wasserman DH. NIH experiment in centralized mouse phenotyping: the Vanderbilt experience and recommendations for evaluating glucose homeostasis in the mouse. *Am J Physiol Metab*. 2009;297(4):E849-E855. doi:10.1152/ajpendo.90996.2008
  165. Viljoen, F.P.; Brand, L.; Smit EJ. An optimized method for the analysis of corticosterone in rat plasma by UV-HPLC. *Med Technol SA*. 2012;26(2):39-42.
  166. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):RESEARCH0034. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808>. Accessed April 10, 2019.
  167. Tuomi JM, Voorbraak F, Jones DL, Ruijter JM. Bias in the Cq value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value. *Methods*. 2010;50(4):313-322. doi:10.1016/j.ymeth.2010.02.003
  168. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(6):e45-e45. doi:10.1093/nar/gkp045
  169. Ruijter JM, Lorenz P, Tuomi JM, Hecker M, van den Hoff MJB. Fluorescent-increase kinetics of different fluorescent reporters used for qPCR depend on monitoring chemistry, targeted sequence, type of DNA input and PCR efficiency. *Mikrochim Acta*. 2014;181(13-14):1689-1696. doi:10.1007/s00604-013-1155-8
  170. Parker VJ, Douglas AJ. Stress in early pregnancy: maternal neuro-endocrine-immune responses and effects. *J Reprod Immunol*. 2010;85(1):86-92. doi:10.1016/j.jri.2009.10.011
  171. Glavin GB, Paré WP, Sandbak T, Bakke HK, Murison R. Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci Biobehav Rev*. 1994;18(2):223-249. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8058215>. Accessed March 11, 2019.
  172. Champagne FA, Meaney MJ. Stress during gestation alters postpartum maternal care and the development of the offspring in a rodent model. *Biol Psychiatry*. 2006;59(12):1227-1235. doi:10.1016/j.biopsych.2005.10.016
  173. Fish EW, Shahrokh D, Bagot R, et al. Epigenetic programming of stress responses through variations in maternal care. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1036(1):167-180. doi:10.1196/annals.1330.011
  174. McCarty R. Cross-fostering: Elucidating the effects of gene × environment

- interactions on phenotypic development. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017;73:219-254. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.12.025
175. Matthews PA, Samuelsson A-M, Seed P, et al. Fostering in mice induces cardiovascular and metabolic dysfunction in adulthood. *J Physiol.* 2011;589(Pt 16):3969-3981. doi:10.1113/jphysiol.2011.212324
176. Rilling JK, Young LJ. The biology of mammalian parenting and its effect on offspring social development. *Science (80- ).* 2014;345(6198):771-776. doi:10.1126/science.1252723
177. Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Roy-Tirelli A, Thorens B. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Metab.* 2002;282(4):E834-E842. doi:10.1152/ajpendo.00332.2001
178. Lehmann J, Stöhr T, Feldon J. Long-term effects of prenatal stress experiences and postnatal maternal separation on emotionality and attentional processes. *Behav Brain Res.* 2000;107(1-2):133-144. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10628737>. Accessed March 11, 2019.
179. Panetta P, Berry A, Bellisario V, et al. Long-Term Sex-Dependent Vulnerability to Metabolic challenges in Prenatally Stressed Rats. *Front Behav Neurosci.* 2017;11(June):1-14. doi:10.3389/fnbeh.2017.00113
180. Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Metab.* 2008;295(6):E1323-E1332. doi:10.1152/ajpendo.90617.2008
181. Ayala JE, Bracy DP, McGuinness OP, Wasserman DH. Considerations in the design of hyperinsulinemic-euglycemic clamps in the conscious mouse. *Diabetes.* 2006;55(2):390-397. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16443772>. Accessed March 11, 2019.
182. Halseth AE, Bracy DP, Wasserman DH. Overexpression of hexokinase II increases insulin and exercise-stimulated muscle glucose uptake in vivo. *Am J Physiol.* 1999;276(1):E70-7. doi:10.1152/ajpendo.1999.276.1.E70
183. Ren JM, Marshall BA, Mueckler MM, McCaleb M, Amatruda JM, Shulman GI. Overexpression of Glut4 protein in muscle increases basal and insulin-stimulated whole body glucose disposal in conscious mice. *J Clin Invest.* 1995;95(1):429-432. doi:10.1172/JCI117673
184. Balasubramanian P, Varde PA, Abdallah SL, Najjar SM, MohanKumar PS, MohanKumar SMJ. Differential effects of prenatal stress on metabolic programming in diet-induced obese and dietary-resistant rats. *Am J Physiol Metab.* 2015;309(6):E582-E588. doi:10.1152/ajpendo.00167.2015
185. Paternain L, De La Garza AL, Batlle MA, Milagro FI, Martínez JA, Campión J. Prenatal stress increases the obesogenic effects of a high-fat-sucrose diet in adult rats in a sex-specific manner. *Stress.* 2013;16(2):220-232. doi:10.3109/10253890.2012.707708

186. Wyrwoll CS, Mark PJ, Mori TA, Waddell BJ. Developmental programming of adult hyperinsulinemia, increased proinflammatory cytokine production, and altered skeletal muscle expression of SLC2A4 (GLUT4) and uncoupling protein 3. *J Endocrinol.* 2008;198(3):571-579. doi:10.1677/joe-08-0210
187. Brunton PJ, Sullivan KM, Kerrigan D, Russell JA, Seckl JR, Drake AJ. Sex-specific effects of prenatal stress on glucose homeostasis and peripheral metabolism in rats. *J Endocrinol.* 2013;217(2):161-173. doi:10.1530/JOE-12-0540
188. Maccari S, Krugers HJ, Morley-Fletcher S, Szyf M, Brunton PJ. The consequences of early-life adversity: neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations. *J Neuroendocrinol.* 2014;26(10):707-723. doi:10.1111/jne.12175
189. McIntyre RS, Soczynska JK, Liao SS, et al. The association between childhood adversity and components of metabolic syndrome in adults with mood disorders: results from the international mood disorders collaborative project. *Int J Psychiatry Med.* 2012;43(2):165-177. doi:10.2190/PM.43.2.e
190. Vargas J, Junco M, Gomez C, Lajud N. Early Life Stress Increases Metabolic Risk, HPA Axis Reactivity, and Depressive-Like Behavior When Combined with Postweaning Social Isolation in Rats. McCormick CM, ed. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162665. doi:10.1371/journal.pone.0162665
191. Sakoda H, Ogihara T, Anai M, et al. Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. *Diabetes.* 2000;49(10):1700-1708. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11016454>. Accessed March 11, 2019.
192. Beaudry JL, Riddell MC. Effects of glucocorticoids and exercise on pancreatic  $\beta$ -cell function and diabetes development. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012;28(7):560-573. doi:10.1002/dmrr.2310
193. D'mello AP, Liu Y. Effects of maternal immobilization stress on birth weight and glucose homeostasis in the offspring. *Psychoneuroendocrinology.* 2006;31(3):395-406. doi:10.1016/j.psyneuen.2005.10.003
194. Othman H, Ammari M, Sakly M, Abdelmelek H. Effects of prenatal exposure to WIFI signal (2.45 GHz) on postnatal development and behavior in rat: Influence of maternal restraint. *Behav Brain Res.* 2017;326:291-302. doi:10.1016/j.bbr.2017.03.011
195. Baran SE, Campbell AM, Kleen JK, et al. Combination of high fat diet and chronic stress retracts hippocampal dendrites. *Neuroreport.* 2005;16(1):39-43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15618887>. Accessed April 1, 2019.

196. Burkuš J, Kačmarová M, Kubandová J, et al. Stress exposure during the preimplantation period affects blastocyst lineages and offspring development. *J Reprod Dev*. 2015;61(4):325-331. doi:10.1262/jrd.2015-012
197. Bruder-Nascimento T, Campos DHS, Alves C, Thomaz S, Cicogna AC, Cordellini S. Effects of chronic stress and high-fat diet on metabolic and nutritional parameters in Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2013;57(8):642-649. doi:10.1590/S0004-27302013000800010
198. Bezpalko L, Gavriilyuk O, Zayachkivska O. Inflammatory response in visceral fat tissue and liver is prenatally programmed: Experimental research. *J Physiol Pharmacol*. 2015;66(1):57-64. [http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/02\\_15/pdf/57\\_02\\_15\\_article.pdf](http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/02_15/pdf/57_02_15_article.pdf) f%5Cn<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed13&NEWS=N&AN=2015768574>.
199. Huang Y-H, Chen C-J, Tang K-S, et al. Postnatal High-Fat Diet Increases Liver Steatosis and Apoptosis Threatened by Prenatal Dexamethasone through the Oxidative Effect. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3):369. doi:10.3390/ijms17030369
200. Franko KL, Forhead AJ, Fowden AL. Differential effects of prenatal stress and glucocorticoid administration on postnatal growth and glucose metabolism in rats. *J Endocrinol*. 2010;204(3):319-329. doi:10.1677/JOE-09-0390
201. Iwasa T, Matsuzaki T, Munkhzaya M, et al. Prenatal exposure to glucocorticoids affects body weight, serum leptin levels, and hypothalamic neuropeptide-Y expression in pre-pubertal female rat offspring. *Int J Dev Neurosci*. 2014;36:1-4. doi:10.1016/j.ijdevneu.2014.03.011
202. Wang X-W, Yu Y, Gu L. Dehydroabietic acid reverses TNF- $\alpha$ -induced the activation of FOXO1 and suppression of TGF- $\beta$ 1/Smad signaling in human adult dermal fibroblasts. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(12):8616-8626. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25674226>. Accessed April 15, 2019.
203. Kaiser G, Gerst F, Michael D, et al. Regulation of forkhead box O1 (FOXO1) by protein kinase B and glucocorticoids: different mechanisms of induction of beta cell death in vitro. *Diabetologia*. 2013;56(7):1587-1595. doi:10.1007/s00125-013-2863-7
204. Cattaneo A, Cattane N, Malpighi C, et al. FoxO1, A2M, and TGF- $\beta$ 1: three novel genes predicting depression in gene X environment interactions are identified using cross-species and cross-tissues transcriptomic and miRNomic analyses. *Mol Psychiatry*. 2018;23(11):2192-2208. doi:10.1038/s41380-017-0002-4
205. Meex RCR, Watt MJ. Hepatokines: Linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(9):509-520.

- doi:10.1038/nrendo.2017.56
206. Mu W, Cheng X, Liu Y, et al. Potential Nexus of Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Type 2 Diabetes Mellitus: Insulin Resistance Between Hepatic and Peripheral Tissues. *Front Pharmacol.* 2019;9(January):1-10. doi:10.3389/fphar.2018.01566
  207. Catrysse L, van Loo G. Inflammation and the Metabolic Syndrome: The Tissue-Specific Functions of NF- $\kappa$ B. *Trends Cell Biol.* 2017;27(6):417-429. doi:10.1016/j.tcb.2017.01.006
  208. Willebrords J, Pereira IVA, Maes M, et al. Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. *Prog Lipid Res.* 2015;59:106-125. doi:10.1016/j.plipres.2015.05.002
  209. Tsai C, Lin Y, Yu H, et al. Melatonin alleviates liver steatosis induced by prenatal dexamethasone exposure and postnatal high-fat diet. *Exp Ther Med.* 2018;16(2):917-924. doi:10.3892/etm.2018.6256
  210. Tsai C-C, Lin Y-J, Yu H-R, et al. Regulation of Leptin Methylation Not via Apoptosis by Melatonin in the Rescue of Chronic Programming Liver Steatosis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3565. doi:10.3390/ijms19113565
  211. Ahrens M, Ammerpohl O, von Schönfels W, et al. DNA methylation analysis in nonalcoholic fatty liver disease suggests distinct disease-specific and remodeling signatures after bariatric surgery. *Cell Metab.* 2013;18(2):296-302. doi:10.1016/j.cmet.2013.07.004
  212. Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab.* 2015;21(5):739-746. doi:10.1016/j.cmet.2015.04.004
  213. Westerbacka J, Kolak M, Kiviluoto T, et al. Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment, and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects. *Diabetes.* 2007;56(11):2759-2765. doi:10.2337/db07-0156
  214. Estall JL, Kahn M, Cooper MP, et al. Sensitivity of lipid metabolism and insulin signaling to genetic alterations in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression. *Diabetes.* 2009;58(7):1499-1508. doi:10.2337/db08-1571
  215. Besse-Patin A, Léveillé M, Oropeza D, Nguyen BN, Prat A, Estall JL. Estrogen Signals Through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Coactivator 1 $\alpha$  to Reduce Oxidative Damage Associated With Diet-Induced Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2017;152(1):243-256. doi:10.1053/j.gastro.2016.09.017
  216. Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, et al. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. Vidal-Puig A, ed. *PLoS Biol.* 2005;3(4):e101. doi:10.1371/journal.pbio.0030101

217. Morris EM, Meers GME, Booth FW, et al. PGC-1 $\alpha$  overexpression results in increased hepatic fatty acid oxidation with reduced triacylglycerol accumulation and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;303(8):G979-92. doi:10.1152/ajpgi.00169.2012
218. Su Q, Baker C, Christian P, et al. Hepatic mitochondrial and ER stress induced by defective PPAR $\alpha$  signaling in the pathogenesis of hepatic steatosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014;306(11):E1264-73. doi:10.1152/ajpendo.00438.2013
219. Loyer X, Paradis V, Hénique C, et al. Liver microRNA-21 is overexpressed in non-alcoholic steatohepatitis and contributes to the disease in experimental models by inhibiting PPAR $\alpha$  expression. *Gut*. 2016;65(11):1882-1894. doi:10.1136/gutjnl-2014-308883
220. Rehman K, Akash MSH, Liaqat A, Kamal S, Qadir MI, Rasul A. Role of Interleukin-6 in Development of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2017;27(3):229-236. doi:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2017019712
221. Ma C, Yu H, Xiao Y, Wang H. *Momordica charantia* extracts ameliorate insulin resistance by regulating the expression of SOCS-3 and JNK in type 2 diabetes mellitus rats. *Pharm Biol*. 2017;55(1):2170-2177. doi:10.1080/13880209.2017.1396350
222. Pedroso JAB, Ramos-Lobo AM, Donato J. SOCS3 as a future target to treat metabolic disorders. *Hormones*. November 2018:1-10. doi:10.1007/s42000-018-0078-5
223. Torisu T, Sato N, Yoshiga D, et al. The dual function of hepatic SOCS3 in insulin resistance in vivo. *Genes Cells*. 2007;12(2):143-154. doi:10.1111/j.1365-2443.2007.01044.x
224. Sachithanandan N, Fam BC, Fynch S, et al. Liver-specific suppressor of cytokine signaling-3 deletion in mice enhances hepatic insulin sensitivity and lipogenesis resulting in fatty liver and obesity. *Hepatology*. 2010;52(5):1632-1642. doi:10.1002/hep.23861
225. Li Y, Wong K, Giles A, et al. Hepatic SIRT1 Attenuates Hepatic Steatosis and Controls Energy Balance in Mice by Inducing Fibroblast Growth Factor 21. *Gastroenterology*. 2014;146(2):539. doi:10.1053/J.GASTRO.2013.10.059
226. Boily G, Seifert EL, Bevilacqua L, et al. SirT1 Regulates Energy Metabolism and Response to Caloric Restriction in Mice. Abraham E, ed. *PLoS One*. 2008;3(3):e1759. doi:10.1371/journal.pone.0001759
227. Banks AS, Kon N, Knight C, et al. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab*. 2008;8(4):333-341. doi:10.1016/j.cmet.2008.08.014
228. Li X, Zhang S, Blander G, Tse JG, Krieger M, Guarente L. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell*.



- 2007;28(1):91-106. doi:10.1016/j.molcel.2007.07.032
229. Sun C, Zhang F, Ge X, et al. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab.* 2007;6(4):307-319. doi:10.1016/j.cmet.2007.08.014
230. Borengasser SJ, Lau F, Kang P, et al. Maternal obesity during gestation impairs fatty acid oxidation and mitochondrial SIRT3 expression in rat offspring at weaning. *PLoS One.* 2011;6(8):e24068. doi:10.1371/journal.pone.0024068
231. Kwon S, Seok S, Yau P, Li X, Kemper B, Kemper JK. Obesity and aging diminish sirtuin 1 (SIRT1)-mediated deacetylation of SIRT3, leading to hyperacetylation and decreased activity and stability of SIRT3. *J Biol Chem.* 2017;292(42):17312. doi:10.1074/JBC.M117.778720
232. Okamoto MM, Anhe GF, Sabino-Silva R, et al. Intensive insulin treatment induces insulin resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver. *J Endocrinol.* 2011;211(1):55-64. doi:10.1530/JOE-11-0105
233. Camps M, Castelló A, Muñoz P, et al. Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues. Heterogeneous response in heart, red and white muscle. *Biochem J.* 1992;282 ( Pt 3):765-772. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1554359>. Accessed March 15, 2019.
234. Machado UF, Shimizu Y, Saito M. Decreased glucose transporter (GLUT 4) content in insulin-sensitive tissues of obese aurothioglucose- and monosodium glutamate-treated mice. *Horm Metab Res.* 1993;25(9):462-465. doi:10.1055/s-2007-1002149
235. Vargas E, Carrillo Sepulveda MA. *Physiology, Glucose Transporter Type 4 (GLUT4).*; 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30726007>. Accessed April 8, 2019.
236. Aiken CE, Ozanne SE. Sex differences in developmental programming models. *REPRODUCTION.* 2013;145(1):R1-R13. doi:10.1530/REP-11-0489
237. Alexander BT. Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 2003;41(3):457-462. doi:10.1161/01.HYP.0000053448.95913.3D
238. Ortiz LA, Quan A, Zarzar F, Weinberg A, Baum M. Prenatal dexamethasone programs hypertension and renal injury in the rat. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 2003;41(2):328-334. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12574103>. Accessed March 15, 2019.