

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**TESIS DOCTORAL**

**Efectos de la subnutrición precoz sobre la sensibilidad a la insulina en hígado y corteza cerebral de ratas lactantes y consecuencias metabólicas de una realimentación hipercalórica en la etapa adulta**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Esther Lizárraga Mollinedo**

Director

Fernando Escrivá Pons

**Madrid, 2014**







UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

**Efectos de la subnutrición precoz sobre la sensibilidad a la insulina en hígado y corteza cerebral de ratas lactantes y consecuencias metabólicas de una realimentación hipercalórica en la etapa adulta**

TESIS DOCTORAL

ESTHER LIZÁRRAGA MOLLINEDO

MADRID, 2014





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

**El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. Fernando Escrivá Pons.**

Opta al grado de Doctor:

**Esther Lizárraga Mollinedo**



Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, entre los años 2008 y 2014. La financiación fue aportada por las siguientes entidades: proyectos BFU2005-02849, BFU2008-02930 del Ministerio de Ciencia e Innovación y BFU 2011-25420 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas (CIBERDEM, Instituto de Salud Carlos III), proyecto S2010/BMD-2423 de la Comunidad de Madrid, proyecto CCG97-UCM/SAL-30041 del Grupo de Investigación Universidad Complutense-Comunidad de Madrid.



## AGRADECIMIENTOS

Aunque sea de sobra conocido, me gustaría empezar recordando que la mayor parte del trabajo científico está basado en las investigaciones de otros, a quienes debemos nuestro más sincero reconocimiento. Además, en este caso me siento en deuda con un gran número de personas sin las que jamás hubiera podido llevar a cabo esta Tesis Doctoral, pues me han ofrecido su ayuda y su apoyo a lo largo de todos estos años.

Quiero comenzar dando las gracias al Director de este trabajo, el Profesor Fernando Escrivá Pons, por enseñarme todo lo que sé de esta área de investigación y aceptar la dirección de esta Tesis. Por su inteligencia, su aspiración a la excelencia y su pulcritud en el trabajo ha sido para mí una guía impecable tanto en la labor experimental como en la intelectual. Además, me ha brindado su ayuda, sus advertencias y sus consejos durante todo este periodo. En cuanto a la escritura de esta Tesis, no hay párrafo que no haya revisado, corregido y mejorado considerablemente; aunque la responsabilidad por los posibles errores es, desde luego, enteramente mía. He tenido la inmensa suerte de trabajar con una gran persona que, en mi opinión, reúne dos cualidades muy difíciles de encontrar en investigadores de su categoría: humanidad y rigor científico. Por eso espero que, durante todo este proceso, sus enseñanzas me hayan hecho mejorar no sólo profesionalmente sino también como persona.

Quiero expresar mi agradecimiento a la Profesora Carmen Álvarez Escolá, investigadora principal del grupo de Endocrinología y Metabolismo Perinatal. Me dio la oportunidad de formar parte de este equipo y lucha diariamente contra todos los inconvenientes de la gestión. Su modo de ser, accesible y afable, ha hecho que siempre sea fácil tratar con ella. Además, desde el principio me ha ofrecido su ayuda y su apoyo en todo lo que he necesitado. Gracias por su sorprendente capacidad para resolver problemas, por su decisión y su empuje.

Debo agradecer a mis compañeros: la Doctora Elisa Fernández Millán y Juan de Toro Martín. A ella, gracias especialmente por llevarme de la mano en mis primeros momentos en el laboratorio, por toda la paciencia que ha derrochado. Porque sigue ayudándome, asesorándome y dándome ánimo cada día, siempre con una gran sonrisa. A él, gracias por dedicarme gran parte de su tiempo, resolverme dudas en el laboratorio y ayudarme siempre. Ha supuesto un ejemplo admirable de dedicación y entusiasmo por la investigación. Gracias por su buen humor y su espíritu positivo, en cualquier tipo de

situación. Realmente ha sido un privilegio contar con estos compañeros excelentes. Ellos consiguen que resulte imposible estar a su lado sin sentirse bien.

Quedo agradecida con la Profesora Pilar Iniesta Serrano, Directora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, por permitirme realizar la Tesis Doctoral en él. Asimismo, también con todos los Catedráticos, Profesores y Doctores: M<sup>a</sup> Isabel Sánchez Reus, Margarita Fernández García de Castro, Manuel Benito de las Heras, Óscar Escribano Illanes, Almudena Gómez Hernández, Carlos Guillén Viejo, Beatriz Gozalbo López, Iria Nieto Vázquez, Carlos Martínez Honduvilla, Carmen de Juan Chocano, Alberto Morán Millán, Cesáreo Roncero Romero, Aránzazu Sánchez Muñoz, Almudena Porras Gallo, Blanca Herrera González, M<sup>a</sup> Isabel Aránguez Alonso, Ángela Martínez Valverde, Carmen Arce de Obieta, M<sup>a</sup> Jesús Oset Gasque, Pilar González González, Sixta Cañadas Correas, M<sup>a</sup> Jesús Miró Obradors y M<sup>a</sup> Teresa Méndez Marco. Los que me resolvieron cualquier duda, me dieron acceso a sus técnicas y materiales y me ofrecieron sus consejos.

También quiero expresar mi gratitud al grupo de Manuel Ros Pérez, Catedrático del Departamento de Bioquímica, Genética y Fisiología de la Universidad Rey Juan Carlos y Coordinador del Consorcio MOIR. Especialmente a las Profesoras Teresa Fernández Agulló y Miriam García San Frutos por trasladar sus equipos estereotáxicos hasta nuestro laboratorio, operar e inyectar a nuestras ratas. Muchas gracias por su valiosa ayuda y su amabilidad.

Del mismo modo, estoy agradecida al equipo de Luis Fernando Alguacil, Catedrático de la Universidad San Pablo CEU y Coordinador de la Unidad de Investigación Traslacional del Hospital General de Ciudad Real. Su colaboración fue imprescindible para realizar los estudios en el núcleo accumbens de las ratas subnutridas (aunque esos resultados no forman parte de esta Tesis). Gracias también especialmente a la Profesora Carmen González-Martín y a las Doctoras Elisabet Salas y Amelia González López.

A la Profesora M<sup>a</sup> del Pilar Ramos Álvarez, de la Universidad San Pablo CEU, por compartir con nosotros la receta de la dieta de cafetería con la que hemos alimentado a varios grupos de animales.

Quiero manifestar mi gratitud al resto del personal del Departamento de Bioquímica: predoctorales, técnicos, administrativos y personal de servicios. Entre ellos,

me gustaría mencionar especialmente a algunas compañeras que crearon el espacio, el tiempo y la confianza necesarios para convertirse en un apoyo muy importante en mi día a día: Tamara Fernández Marcelo, Irene Pascua García y Jacqueline Head Abad. En primer lugar, les quiero agradecer toda la ayuda que me han ofrecido en el laboratorio. Me han enseñado a trabajar con el ARN, me han aconsejado cada vez que he tenido algún problema y me han aclarado cada cuestión que les he planteado. Muchas gracias por su paciencia, hablar con ellas siempre ha sido una gran ayuda. A Tamara, muchas gracias por sus opiniones y advertencias, por escucharme y no dejarme caer en el pesimismo, ofreciéndome su ánimo y su sonrisa. Por su sensatez y sus respuestas ingeniosas a mis comentarios ridículos (a veces incluso citando a un gran filósofo) desde su rincón en la biblioteca, aunque estuviera ocupada y agobiada. Es una persona inteligente y estupenda, metódica, perfeccionista y muy sensata. A Irene, gracias por sus dosis de realidad, porque con su mirada expresiva ya me sacaba de la ofuscación y me hacía reír. Muchas gracias por sus plazos imaginarios para acabar los capítulos de mi Tesis, por cuidarme, preocuparse por mí y no permitirme estar desanimada. A Jacquie, esa personita tranquila y risueña del laboratorio 36. Práctica, llena de vida y polifacética (debo pedirle perdón por las pequeñas bromas sobre eso: Jacquie cultiva, Jacquie metila, Jacquie cuenta...). Ella sí que sabe aprovechar el tiempo, estirarlo bien y “hacer de su capa un sayo”. También quiero mencionar a Sabela Díaz-Castroverde Vicario (Chábeli) y Vanesa Viana Huete (mi compañera favorita en los congresos), por suponer una influencia tan positiva para mí. Gracias por ofrecerme sus puntos de vista y por todos los buenos momentos que han compartido conmigo. Son, todas ellas, magníficas y no imagino haber acabado este trabajo sin su ímpetu, risas y largas conversaciones. Francamente, me he sentido muy cuidada y arropada. Su capacidad de aliento es asombrosa e inagotable.

A todos los estudiantes que han pasado por el Departamento y por el grupo, especialmente a Isabelle Vatus, Tjasa Bedene, Diego Martínez y Patricia Hernández, les agradezco su ayuda en el laboratorio con tantísimas ganas e ilusión. De la misma forma a nuestra antigua compañera: la Doctora Laura de Miguel de Santos.

Como no podía ser de otra manera, les doy las gracias al resto de Departamentos en la Facultad de Farmacia, como el de Bromatología, en el que pasé algunos momentos pulverizando pienso para rata y molestando con el ruido de la *Thermomix*. Igualmente a los Centros de Apoyo a la Investigación (CAIs) de la UCM, entre ellos el de Genómica y

el de Resonancia Magnética Nuclear. En especial, gracias a Rosa M<sup>a</sup> Pérez Díaz y a M<sup>a</sup> Encarnación Fernández Valle.

Quedo agradecida con el grupo del Profesor Bernard Portha, de la Universidad de París, donde realicé una estancia de tres semanas. Y aunque la técnica que aprendí no forma parte de esta Tesis, fue una experiencia muy enriquecedora. Gracias sustancialmente a Audrey Riboulet-Chavey, por enseñarme a extraer el páncreas de los fetos de 13,5 días de gestación y a Marie-Nöelle Gangnerau, por ser mi guía en París.

A los investigadores: M<sup>a</sup> Ángeles Martín Arribas, Sonia Ramos Rivero y Luís Goya Suárez del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN). Por sus consejos y su ayuda, por compartir conmigo muy buenos momentos y por derrochar amabilidad y simpatía: muchas gracias. También a todos los predoctorales y doctores que nos acompañaron en muchos almuerzos en la cafetería del CIB.

Sin ninguna duda, además de todas las personas que han estado trabajando conmigo y ayudándome directamente en el Departamento, también ha habido otras que lo han hecho en la distancia: mi familia. Gracias especialmente a Carmen Mollinedo Galera, una mente privilegiada y una persona maravillosa y extraordinariamente importante en mi vida, de la que estoy aprendiendo día tras día y que tanto me ha apoyado de manera incondicional y permanente. Muchísimas gracias por su incalculable generosidad y cariño, y por ser toda una lección de vitalidad y energía positiva. A la Profesora Carmen Lizárraga Mollinedo, por ser un ejemplo de fortaleza y coraje necesarios para afrontar las situaciones difíciles. Gracias por sus buenos consejos, por recordarme que de vez en cuando es necesario vaciar un poco el vaso antes de que cualquier gota lo colme. Gracias por decirme que si me estaba costando trabajo, es que lo estaba haciendo bien. A Angustias Galera López, por preocuparse tantísimo por mí y tenerme siempre en sus pensamientos. Gracias por todo su cariño, su apoyo y por luchar y esforzarse diariamente en seguir siendo una de las mejores personas que conozco. A Juan Ramón Nogueras Lizárraga, sólo espero que cuando sea adulto siga siendo tan inteligente y especial como lo es de adolescente, muchas gracias por ser para mí “la sal de la tierra”. También quisiera darles las gracias a Luís J. Mollinedo por el soporte informático y por sus consejos, y a Jose L. Mollinedo, por las conversaciones y los aperitivos al sol. Por supuesto, gracias al Profesor Fernando López Castellanos por sus recomendaciones, su buen humor y sus invitaciones a incontables refrescos de cola y comidas. Y a Jose Morente Bueno, muchas gracias por su cordialidad, por alegrarme

tantas veces con su manera de ser espontánea y jovial, así como por obsequiarme con su afecto sincero y desinteresado.

Quisiera también mencionar especialmente a M<sup>a</sup> Teresa Pastor Gutiérrez y Denise Seligsohn, que fueron durante un tiempo “mi pequeña familia” en Madrid. Por las charlas (por turnos) en el salón, por sus consejos, por hacerme reír, animarme tantísimo e incluso haber tenido que aguantar algún discurso sobre ratas y subnutrición.

Además estoy sumamente agradecida a mis amigas y amigos por disculpar no sólo que, en determinadas épocas, la dedicación exclusiva que le he dedicado a esta tarea me volviera insoportable; sino por aceptar mis ausencias sin caras largas.

“Aquél que recibe un beneficio, nunca debe olvidarlo; así como aquél que lo otorga, no debería recordarlo”, por esta razón, gracias también al Doctor Enrique Lizárraga Febres.





# ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	23
<b>ABREVIATURAS</b> .....	27
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	35
<b>1.- Subnutrición. Antecedentes</b> .....	35
1.1.- Subnutrición y obesidad en el mundo: una paradoja.....	35
1.2.- Concepto de programación fetal.....	36
1.3.- El invierno del hambre en Holanda (“Dutch Hunger Winter”) y otras hambrunas .....	37
1.4.- Modelos de subnutrición en animales .....	38
1.5.- Subnutrición y homeostasis glucídica .....	40
1.6.- Diabetes de tipo II y subnutrición precoz.....	40
<b>2.- Sistema Nervioso Central y subnutrición</b> .....	42
2.1.- Acciones de la insulina sobre el SNC.....	43
2.2.- Requerimientos energéticos de las células nerviosas .....	44
2.2.1.- Sustratos energéticos a lo largo del desarrollo .....	45
2.2.2.- Origen hepático de los cuerpos cetónicos.....	46
2.2.3.- Transportadores de cuerpos cetónicos: MCTs.....	47
<b>3. Regulación de la ingesta</b> .....	48
3.1.- Eje insulina-glucagón .....	49
3.2.- Hipotálamo .....	51
3.3.- Factores reguladores del apetito a corto plazo .....	52
3.4.- Mecanismos de control de la ingesta a largo plazo: insulina y leptina .....	53
3.4.1.- Vía de señales de la insulina .....	53
3.4.2.- Vía de señales de la leptina.....	57
3.4.3.- Interacción de las vías de señales de la insulina y leptina.....	59
<b>4.- Obesidad y homeostasis glucídica</b> .....	60
4.1.- Epidemia de obesidad global .....	60
4.2.- Modelos de sobrealimentación en animales: dietas de cafetería vs. dietas altas en grasa.....	61
4.3.- Resistencia a insulina y obesidad.....	62
4.3.1.- Mecanismos de resistencia a la insulina .....	63
4.4.- Almacenamiento de la grasa .....	64

4.4.1.- El tejido adiposo .....	64
4.4.2.- Disfunciones del tejido adiposo .....	65
4.4.3.- Infiltración de grasa ectópica en los tejidos.....	66
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>69</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>73</b>
<b>1.- Animales y dietas.....</b>	<b>73</b>
1.1.- Pautas de nutrición.....	73
1.2.- Composiciones del pienso estándar y la dieta de cafetería.....	73
1.3.- Ratas controles .....	74
1.4- Ratas subnutridas .....	75
1.5.- Ratas realimentadas con la dieta de cafetería .....	76
<b>2.- Tratamientos hormonales.....</b>	<b>76</b>
2.1.- Clamp hiperinsulinémico-euglucémico en ratas adultas.....	77
2.2.- Inyecciones intracerebroventriculares de insulina y leptina en ratas adultas	78
2.3.- Inyecciones intravenosas de glucagón en ratas lactantes .....	79
<b>3.- Análisis de metabolitos y hormonas .....</b>	<b>80</b>
3.1.- Toma de muestras.....	80
3.2.- Análisis de la glucosa en sangre total o suero .....	80
3.3.- Análisis de cuerpos cetónicos en sangre desproteinizada .....	80
3.4.- Análisis de la insulina en suero sanguíneo .....	81
3.5.- Análisis de glucagón en suero sanguíneo .....	81
3.6.- Análisis de leptina en suero sanguíneo .....	82
3.7.- Determinación de glucógeno hepático y cortical.....	83
3.8.- Determinación de lactato, piruvato, cuerpos cetónicos y glucosa hepáticos ....	83
3.9.- Determinación de triglicéridos y colesterol.....	84
3.10.- Extracción de lípidos tisulares.....	85
3.11.- Determinación de ácido úrico hepático.....	85
3.12.- Valoración de proteínas .....	86
<b>4.- Análisis de las actividades enzimáticas.....</b>	<b>86</b>
4.1.- Enzimas de las vías de síntesis y utilización de cuerpos cetónicos .....	86
4.2.- Actividad de la PI 3-kinasa.....	87
4.3.- Actividad de la $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa .....	88
<b>5.- Técnicas de fraccionamiento subcelular .....</b>	<b>88</b>
5.1.- Obtención de mitocondrias hepáticas .....	88

5.2.- Obtención de mitocondrias corticales.....	88
5.3.- Separación de capilares corticales.....	89
5.4.- Aislamiento de membranas corticales .....	89
6.- Preparación de lisados tisulares .....	90
7.- Inmunoprecipitaciones.....	90
8.- Análisis de proteínas específicas: procedimiento del “Western Blotting” .....	91
8.1.- Preparación de las muestras.....	91
8.2.- Electroforesis y transferencia a membrana .....	91
8.3.- Inmunodetección.....	93
8.4.- Borrado y reutilización de las membranas.....	93
9.- Inmunohistoquímica de la corteza cerebral e hipotálamo .....	94
9.1.- Fijación e inclusión en parafina .....	94
9.2.-Montaje de los cortes en los portaobjetos.....	94
9.3.- Marcaje con anticuerpos.....	95
9.4.- Análisis histoquímico del glucógeno.....	96
9.5.- Toma de imágenes .....	96
10.- Análisis de la expresión génica.....	97
10.1.- Extracción del ARN hipotalámico.....	97
10.2.- Determinación de la integridad del ARN.....	97
10.3.- Transcripción inversa del ARN .....	98
10.4.- Desarrollo de la RT-qPCR.....	98
10.5.- Cálculo de la expresión génica relativa.....	99
11.- Estudios de imagen de Resonancia Magnética Nuclear .....	99
11.1.- Tratamiento de las imágenes .....	100
11.2.- Cuantificación de la grasa visceral y subcutánea.....	101
11.3.- Medición de parámetros antropométricos .....	101
12.- Expresión de los resultados .....	101
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>105</b>
1.- Estudio del hígado de ratas lactantes .....	105
1.1.- Características del hígado de las ratas lactantes de 10 días.....	105
1.2.- Actividades de enzimas mitocondriales del metabolismo cetónico .....	105
1.3.- Transportadores de glucosa y monocarboxilatos .....	106
1.4.- Enzimas reguladoras del metabolismo del glucógeno.....	107
1.5.- Vía de señalización de la insulina.....	107
1.6.- Sensibilidad hepática al glucagón .....	109

<b>2.- Estudio de la corteza cerebral de ratas lactantes .....</b>	<b>110</b>
<b>2.1.- Características generales de las ratas lactantes de 10 días .....</b>	<b>110</b>
<b>2.2.- Transportadores de glucosa: GLUTs.....</b>	<b>112</b>
<b>2.3.- Proteínas de la vía de señalización de la insulina .....</b>	<b>113</b>
<b>2.4.- AMPK y ACC.....</b>	<b>116</b>
<b>2.5.- Efecto de la subnutrición sobre las MAPKs y algunas proteínas de la vía     apoptótica .....</b>	<b>117</b>
<b>2.6.- Enzimas de utilización de cuerpos cetónicos y transportadores de     monocarboxilatos en la corteza cerebral.....</b>	<b>119</b>
<b>3.- Estudio de los efectos de la realimentación con dieta hiperlipídica en ratas subnutridas.....</b>	<b>120</b>
<b>3.1.- Evolución del peso corporal .....</b>	<b>120</b>
<b>3.2.- Ingestas .....</b>	<b>121</b>
<b>3.3.- Características antropométricas .....</b>	<b>122</b>
<b>3.3.1.- Peso .....</b>	<b>122</b>
<b>3.3.2.- Distancia naso-anal .....</b>	<b>123</b>
<b>3.3.3.- Diámetros abdominal y torácico.....</b>	<b>123</b>
<b>3.3.4.- Índice de masa corporal .....</b>	<b>124</b>
<b>3.3.5.- Índice de Lee.....</b>	<b>124</b>
<b>3.4.- Glucemia e insulinemia .....</b>	<b>124</b>
<b>3.5.- Trigliceridemia y colesterolemia .....</b>	<b>125</b>
<b>3.6.- Análisis cuantitativo del tejido adiposo blanco.....</b>	<b>125</b>
<b>3.6.1.- Grasa total.....</b>	<b>127</b>
<b>3.6.2.- Grasa visceral.....</b>	<b>127</b>
<b>3.6.3.- Grasa subcutánea .....</b>	<b>128</b>
<b>3.7.- Grasa ectópica.....</b>	<b>128</b>
<b>3.8.- Ácido úrico en el hígado.....</b>	<b>129</b>
<b>3.9.- Efectos de la subnutrición y realimentación sobre la leptinemia .....</b>	<b>130</b>
<b>3.10.- Efectos de la subnutrición sobre el hipotálamo.....</b>	<b>131</b>
<b>3.10.1- Expresión y contenido de POMC.....</b>	<b>131</b>
<b>3.10.2.- Expresión y contenido de NPY.....</b>	<b>132</b>
<b>3.10.3.- Sensibilidad hipotalámica a la insulina .....</b>	<b>133</b>
<b>3.10.4.- Sensibilidad hipotalámica a la leptina.....</b>	<b>138</b>
<b>3.11.- Efectos de la subnutrición y realimentación sobre la sensibilidad global a la     insulina .....</b>	<b>140</b>

<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	145
1.- Efecto de la subnutrición sobre el metabolismo hepático durante la lactancia....	145
1.1.- Glucemia y cetonemia en las ratas lactantes subnutridas.....	145
1.2.- Contenido hepático de glucógeno.....	146
1.3.- Sensibilidad hepática a la insulina.....	147
1.4.- Sensibilidad hepática al glucagón .....	148
1.5.- Cetogénesis hepática.....	149
2.- Efecto de la subnutrición sobre el córtex durante la lactancia.....	151
2.1.- Glucógeno y transportadores de glucosa en el córtex .....	152
2.2.- Capacidad de uso y transporte de los cuerpos cetónicos en el córtex .....	153
2.3.- Vía cortical de señales de la insulina.....	155
2.4.- Subnutrición y GSK3 cortical.....	156
2.5.- Efecto de la subnutrición sobre el AMPK en el córtex.....	157
2.6.- MAP kinasas y proteínas apoptóticas .....	158
3.- Efecto de la realimentación con dieta hipercalórica en ratas adultas crónicamente subnutridas .....	160
3.1.- Características de la fórmula de cafetería.....	160
3.2.- Efecto de la realimentación sobre la ingesta.....	161
3.3.- Efecto de la realimentación sobre el peso y otros parámetros antropométricos .....	162
3.4.- Efecto de la realimentación sobre la grasa visceral y subcutánea .....	163
3.5.- Efecto de la realimentación sobre la lipemia y la grasa ectópica .....	164
3.6.- Insulina: niveles séricos y sensibilidad global.....	166
3.7.- Efecto de la subnutrición sobre la leptinemia .....	168
3.8.- Efecto de la subnutrición sobre péptidos orexigénicos y anorexigénicos.....	169
3.9.- Efecto de la subnutrición sobre la sensibilidad hipotalámica a la leptina .....	170
3.10.- Efecto de la subnutrición sobre la sensibilidad hipotalámica a la insulina .	171
3.11.- Efecto de la subnutrición sobre las MAPKs en el hipotálamo.....	173
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	179
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	183
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	217



# ABSTRACT

## Introduction

Undernutrition is one of the most important public health problems. It affects more than 800 million individuals around the world. Exposure to maternal undernutrition during development increases the risk for long-term pathological effects. Although this subject has been previously studied by several authors, there are some pathways still have not well defined. There are divergences in the published results probably due to disparities in the definition of variables such as: onset, severity and duration of the food restriction. Many people all over the world, especially in developing countries, were poorly nourished from immaturity and now, in a short time, have experienced a shift toward Western eating habits. Therefore, understanding the relation between early nutrition and possible deleterious consequences is an open question replete with important social and health implications. Animal models are actually helpful to study this enquiry.

Our group has an extensive background in an animal model of Wistar Rats chronically undernourished since gestation. In view of previous results of insulin hypersensitivity developed by these animals in peripheral tissues (skeletal muscle, adipose tissue and cardiac muscle) we decided to focus on different subjects not well investigated yet and related with glucidic homeostasis.

## Objectives

- ❖ **1.-** To investigate the effects of a protein-caloric restriction on the endocrine and metabolic profiles in the liver of suckling rats, specifically regarding the hepatic responses to both insulin and glucagon.
- ❖ **2.-** To analyze the impact of that early undernutrition on the cortical insulin signaling pathway during suckling.
- ❖ **3.-** To assess the influence of early and chronic undernutrition on the consequences that a transference to a high-lipid diet could have on adult rats: impact on hypothalamic regulation of food intake, distribution of white adipose tissue, serum lipid levels, ectopic fat and global sensitivity to insulin.

## Results

First of all, we analyzed the regulatory mechanisms of insulin and glucagon to supply glucose and ketone bodies for the brain. We found glucagon resistance and insulin hypersensitivity. Undernutrition led to hypoglycemia and hyperketonemia. Secondly, we found some alterations in the levels of several proteins of the insulin signaling pathway in the cerebral cortex of suckling rats. It was related with the diminished expression of the active forms of: GSK3, AMPK, p38MAPK and JNK, implicated in crucial cellular processes at this stage of growth. We also found a major content of glycogen and glucose transporters. Finally, we investigated the major predisposition to suffer from some deleterious effects associated with obesity when previously undernourished animals were submitted to an enriched diet in calories and lipids. We found that early undernutrition induced hyperphagic behavior, dislipidemia and higher accumulation of ectopic fat. These effects could be linked to an altered development of hypothalamus during suckling (leading to hypothalamic resistance to insulin and leptin in adulthood).

## Conclusions

As regards the first objective:

- ❖ Early undernutrition induced changes resulting in a situation which is opposite to physiological condition concerning hepatic responses to both insulin and glucagon during suckling period (that means insulin hypersensitivity and glucagon resistance). Undernutrition led to hypoglycemia and hyperketonemia. Despite those changes, the liver developed higher capacities for exporting ketone bodies. However, these disturbances in the endocrine profile and plasma substrates, coinciding with the brain growth spurt, may cause harmful effects on crucial organs, like Central Nervous System.

Referring to the second objective:

- ❖ We proved that insulin, intraperitoneally injected reached the cortex and rapidly phosphorylated its receptor.
- ❖ Higher glycogen levels in the astrocytes of undernourished animals, together with the notably increase of the phosphorylated forms of GSK3, AMPK,

p38MAPK and JNK, could have implications in the correct development of this organ and increase the risk of suffering from several cognitive deficits and mental disorders associated with severe food restriction.

Finally, regarding the third objective we can conclude:

- ❖ An increase in NPY and diminished levels of POMC as well as the resistance to insulin and leptin in the hypothalamus, leading to the hyperfagia in the re-fed rats previously food restricted.
- ❖ Also, undernutrition reduced serum leptin levels, influencing on the development of hypothalamus during suckling, when leptin is very important to its correct growth.
- ❖ After the transference to a high-caloric diet, we found some pathological consequences in previously undernourished rats not established in controls: a) deeper increase of the proportion in visceral fat, b) hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia, c) ectopic lipid accumulation in liver and skeletal muscle and an increase in hepatic uric acid level, d) a higher drop in the global sensitivity to insulin.



# ABREVIATURAS

## A

- ACC: Acetil-coenzima A carboxilasa
- ADNc: Adenosina difosfato cíclico
- AGC-quinasas: Kinasas enlazadas a proteínas G
- AgRP: Proteína relacionada con Agouti
- Akt/PKB: Proteína kinasa B
- AMP: Adenosina monofosfato
- AMPc: Adenosina monofosfato cíclica
- AMPK: Proteína kinasa activada por adenosina monofosfato
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico
- ATP: Adenosina trifosfato
- ATP: Adenosina trifosfato

## B

- Bad: Promotor de muerte asociado a la familia Bcl-2 (*Bcl-2-associated death promoter*)
- BAT: Tejido adiposo marrón
- Bax: Proteína X asociada a la familia Bcl-2 (*Bcl-2-associated X protein*)
- Bcl-xL: Proteína extra-larga de célula B de linfoma (*B-cell lymphoma-extra large*)
- BHE: Barrera hematoencefálica
- BSA: Albúmina sérica bovina

## C

- C/EBP $\alpha$ : Factor de transcripción relacionado con las proteínas CEBP
- CART: Tránsito regulado por cocaína y anfetamina
- CCK: Colecistoquinina
- CoA: Coenzima A
- CPT: Carnitina palmitoil transferasa
- CREB: Proteína de unión en respuesta a cAMP (*response element-binding protein*)

## D

Da: Dalton

DAB: tetrahidrocloreuro de 3-3'-diaminobencidina

DTT: Ditiotreitolo

## E

4E-BP1: Proteína de unión al factor 4E en la iniciación de la traducción en eucariotas

EDTA: Ácido etilén-diamino tetraacético

EGTA: Ácido etilén-glicol tetraacético

eIF4E: Factor 4E de iniciación de la traducción en eucariotas

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

Epac: *cAMP-dependent guanine-nucleotide-exchange factors for the small GTPases Rap1 and Rap2*

ERK: Kinasa regulada por señal extracelular (*extracellular signal-regulated kinases*)

## F

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

Fyn: Proteína tirosina-kinasa Fyn

## G

g: Fuerza centrífuga relativa

Gcgr: Receptor de glucagón (*G-coupled glucagon receptor*)

GLP (1 y 2): *Glucagon like peptide 1 y 2*

GLUTs: Transportadores de glucosa

GP: Glucógeno fosforilasa

Grb-2: Proteína de unión al receptor del factor de crecimiento (*Growth factor receptor-bound protein 2*)

GS: Glucógeno sintasa

GSK3: Glucógeno sintasa kinasa 3

GTPasas Rho: Trifosfatasa de guanosina (familia Rho)

## H

HH: Hidracina-hidrato

HLA: Área hipotalámica lateral

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A

## I

- i.c.v.: Intracerebroventricular  
i.p.: Intraperitoneal  
IKKbeta: Kinasa del factor kappa  
IL-1: Interleukina 1  
IL-6: Interleukina 6  
IMC: Índice de masa corporal  
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible  
IR: Receptor de insulina  
IRSs: Sustratos del receptor de insulina

## J

- JAK: *Janus* kinasa  
JNK: *Jun* kinasa

## K

- kcal: Kilocaloría  
kDa: Kilodalton

## M

- $\alpha$ -MSH: Hormona estimulante de melanocitos  
MAPKs: Proteínas kinasas activada por mitógenos  
MCP-1: Proteína 1 quimiotáctica de monocitos (*monocyte chemotactic protein-1*)  
MCT: Transportador de monocarboxilatos  
mTOR: Proteína diana de rapamicina en mamíferos (*mammalian target of rapamicin*)

## N

- NO: Óxido nítrico  
NPY: Neuropeptido Y

## O

- OBR: Receptor de leptina  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
OXA: Orexina A

OXB: Orexina B

## P

P38MAPK: Proteína kinasa de 38 kDa activada por mitógenos

P70S6K: Serina-treonina kinasa de 70 kDa que fosforila a la subunidad ribosomal S6

PAS: Ácido peryódico de Schiff

PBS: Tampón fosfato salino

PK1: Kinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos (*phosphoinositide-dependent kinase-1*)

PEG: Polietilenglicol

PFA: Área perifornical

PH: Dominio de unión a plecstrina

PI3K: Fosfatidil inositol 3 kinasa

PIP3: Fosfatidil inositol trifosfato

PKA: Proteína kinasa A

PKC: Proteína kinasa C

POMC: Proopiomelanocortina

PP: Polipéptido pancreático

PPAR $\gamma$ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

PTP1B: Proteín tirosina fosfatasa 1B

PTPasa: Proteín-tirosina fosfatasa

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

PVN: Núcleo paraventricular

PYY: Péptido YY

## Q

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa en tiempo real

## R

RIA: Radioinmunoensayo

RIPA: Tampón de radioimmunoprecipitación (*Radioimmunoprecipitation assay buffer*)

## S

SAT: Tejido adiposo subcutáneo

SDS: Dodecil sulfato sódico

SEM: Error estándar de la media

SH2: Dominio de unión a SH2 (*src homology 2*)

SHP2: Tirosina fosfatasa 2 que contiene dominios de homología Src (*tyrosine phosphatase containing Src Homology 2 domains*)

SIDA (VIH): Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Virus de Inmunodeficiencia Humana)

SNC: Sistema Nervioso Central

SOCS3: Supresor 3 de señalización de citocinas

SOS: Proteína '*son of sevenless*'

SREBP-1: Proteína 1 de unión a elementos reguladores de esterol (*sterol regulatory element-binding protein 1*)

STAT3: Señal 3 transductora y activadora de la transcripción (*Signal transducer and activator of transcription-3*)

## T

TBS: Tampón tris salino (*Tris-buffered saline*)

TEA: Trietanolamina

TEC-quinasas: Familia de kinasas Tec

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamina

TNF- $\alpha$ : Factor alfa de necrosis tumoral

Torc: Trasductor de proteínas de unión a CREB (*Transducer of regulated CREB-binding proteins*)

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

TSC1/TSC2: Proteínas de esclerosis tuberosa 1 (hamartina) y 2 (tuberina)

T-TBS: Tampón tris salino enriquecido con Tween

## U

UI: Unidades internacionales

UV: Ultravioleta

## V

VAT: Tejido adiposo visceral

VMN: Núcleo ventromedial

## W

WAT: Tejido adiposo blanco





# I. INTRODUCCIÓN



# I. INTRODUCCIÓN

## 1.- Subnutrición. Antecedentes

### 1.1.- Subnutrición y obesidad en el mundo: una paradoja

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), los últimos datos reflejan que en el periodo 2010-2012, 870 millones de personas padecieron hambre crónica. Esta cifra supone una octava parte de la población mundial y se refiere a personas permanentemente desnutridas por la falta continuada de alimentos. Este problema de grandes dimensiones afecta mayoritariamente a los países subdesarrollados y en vías de desarrollo. Sin embargo, en los países desarrollados “únicamente” 16 millones de personas están subnutridas, cifra que supone un incremento con respecto de los 13 millones que se dataron en el periodo 2004-2006. El impacto de la crisis financiera actual podría agravar esta situación. No obstante, la metodología e indicadores de la FAO no permiten, por el momento, cuantificar los efectos a corto plazo de esa crisis (FAO; Informe SOFI, 2012).

La distribución geográfica del hambre se concentra, fundamentalmente, en regiones de Asia e islas del Pacífico y América del Sur, donde la cifra de hambrientos ha disminuido en las últimas décadas; así como en África, donde el número de personas subnutridas, por el contrario, se ha incrementado (FAOSTAT, 2010).

Globalmente, un 26% de los niños menores de cinco años están malnutridos, según datos de la OMS para 2011. Esta franja de edad es especialmente sensible, puesto que constituye una etapa crucial de desarrollo y crecimiento. En consecuencia, todos los sistemas orgánicos se ven afectados por la falta de nutrientes: desde el Sistema Nervioso Central, provocando retrasos en el aprendizaje y déficit cognitivos (Bhoomika & col., 2008), hasta los sistemas cardiovascular e inmunológico, viéndose aumentada la susceptibilidad para padecer alteraciones secundarias asociadas con la subnutrición (afecciones respiratorias, infecciones intestinales) (Beisel, 1996). Muchas personas desarrollan, incluso, formas de subnutrición extremas como kwashiorkor o marasmo, patologías derivadas de carencias nutricionales muy acusadas y severas (Forrester & col., 2012).

En la actualidad, obesidad y subnutrición son problemas que coexisten dentro de las mismas zonas geográficas. Esta transición nutricional (subnutrición seguida de sobrepeso) en países como Brasil o la India, se está produciendo especialmente dentro de los sectores más pobres donde las carencias nutricionales eran más acusadas (Joshi & col., 2012). Como se detallará más adelante, hay estudios que demuestran que las personas que han estado previamente subnutridas presentan una composición corporal y unas características metabólicas más propensas a desarrollar obesidad y la consecuente acumulación de grasa ectópica, así como otras enfermedades asociadas (Victora & col., 2008; Martins & col., 2004; Bénéfice & col., 2001).

### **1.2.- Concepto de programación fetal**

Desde el momento en que un individuo es concebido, se van definiendo sus futuras características fisiológicas e incluso psicológicas en función del entorno en que se desarrolle. El concepto de programación fetal se refiere al proceso por el que un estímulo o daño producido durante etapas críticas del desarrollo determinarán consecuencias a largo plazo, como sugirieron Hales & Barker (Hales & Barker, 1992). Estos autores propusieron que la nutrición materna podría programar precozmente la aparición de enfermedades cardiovasculares así como diabetes de tipo II y obesidad. En concreto, su hipótesis indica lo siguiente: cuando un organismo es sometido a un ambiente fetal no adecuado, sufrirá alteraciones en algunos órganos clave como el hígado o el páncreas, a expensas de proteger órganos aún más vitales, como el cerebro (Malamitsi-Puchner, 2006). Con respecto a la nutrición, el feto experimentará estas adaptaciones para conseguir su supervivencia bajo un estado deficitario. Sin embargo, esto conllevará que su metabolismo ulterior quede condicionado y cuando las circunstancias cambien (p. ej. abundancia de alimentos), no responderá de manera adecuada al incremento de nutrientes ni llevará a cabo correctamente el almacenamiento de este exceso. Esta hipótesis es conocida como “hipótesis del fenotipo ahorrador”. De acuerdo con ella, el riesgo de sufrir enfermedades metabólicas a largo plazo aumenta considerablemente cuando las circunstancias precoces fueron adversas; de hecho, se han realizado numerosos estudios clínicos y epidemiológicos que lo confirman (Ford & col., 2007; Ravelli & col., 1999; Barker, 1992). Además, el concepto se extiende tanto a condiciones de nutrición deficiente como a circunstancias de sobrealimentación materna, así como a la exposición del feto a estrés, hipoxia, infecciones, etc.; estas situaciones y sus consecuentes riesgos se han esquematizado en la Fig. 1.

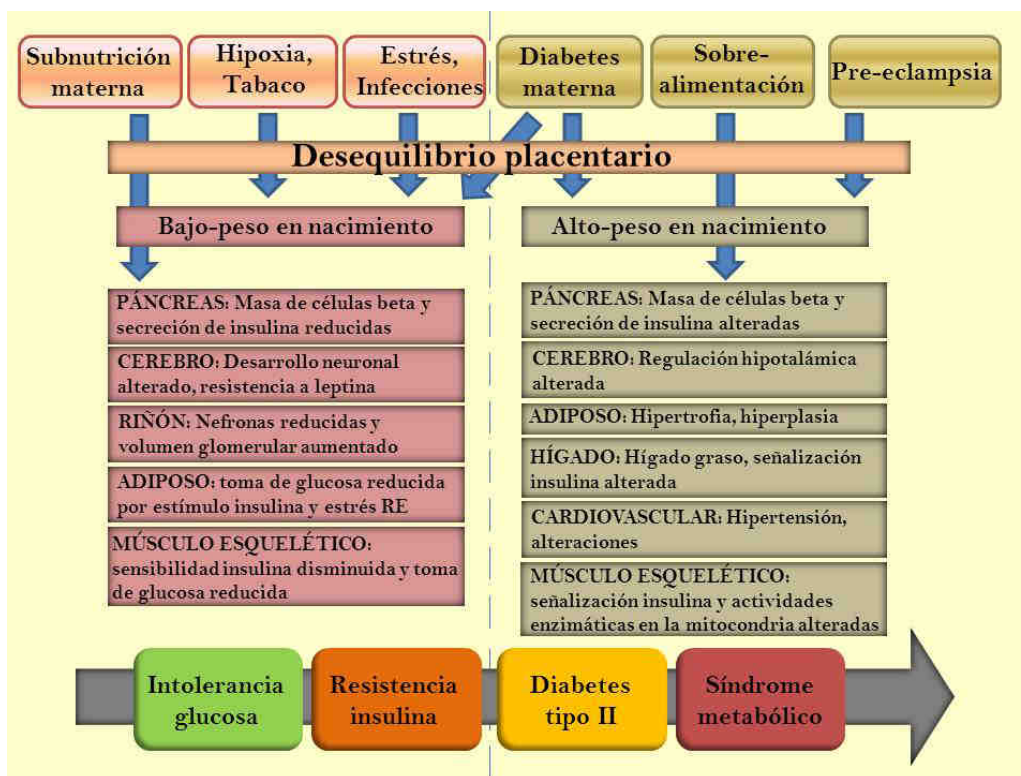


Fig.1. Adaptado de Fernández-Twinn & Ozanne, 2010.

### 1.3.- El invierno del hambre en Holanda (“Dutch Hunger Winter”) y otras hambrunas

Durante el invierno de 1944, casi al final de la Segunda Guerra Mundial, la cantidad de comida disponible en los Países Bajos era cada vez más escasa. Como consecuencia de una huelga de transportes, la ocupación militar alemana decretó la paralización de la entrada de alimentos por cualquier medio, con lo que la situación de escasez nutricional se extremó en gran medida. Durante todo el lapso de tiempo que duró este veto, las raciones de alimentos que recibían los ciudadanos se estimaron en 400-800 kcal/día. Esta situación afectó a gente de todas las clases sociales y edades, incluyendo mujeres embarazadas. Posteriormente, tras la liberación de los Países Bajos, se sucedió un periodo de crecimiento económico en el país y la alimentación se normalizó (Schulz, 2010).

Esta hambruna ha sido objeto de numerosos estudios, pues supone una experiencia única, aunque trágica, para conocer los efectos de una privación nutricional intrauterina sobre la predisposición a enfermedades en las generaciones posteriores (van Abeelen & col., 2012; Roseboom & col., 2006).

A lo largo de la historia, otras hambrunas también se han investigado de manera profusa. Por ejemplo, la que tuvo lugar en Grecia en 1941. Como consecuencia de la ocupación de este país en la Segunda Guerra Mundial, se bloqueó el transporte naval y, por tanto, de alimentos. A pesar de la corta duración de la hambruna, tuvo consecuencias negativas sobre el desarrollo de los descendientes, que estuvieron sometidos a restricción alimentaria intrauterina (Neelsen & Stratmann, 2011). También se han realizado estudios epidemiológicos en inmigrantes irlandeses de Estados Unidos cuyos ascendientes padecieron los efectos de la hambruna en su país de origen en 1846; se ha estimado un mayor número de casos de enfermedad cardiovascular a causa de la restricción nutricional de la madre durante ese periodo de escasez (Kelleher & col., 2004). Otro ejemplo es la hambruna de China durante los años 1959-1961, donde los descendientes de individuos expuestos a una condición de hambre aguda presentaron mayor riesgo de padecer enfermedades mentales en la edad adulta (Huang & col., 2012).

Todos estos dramáticos hechos que, desafortunadamente, se siguen repitiendo en la actualidad como consecuencia de conflictos armados, catástrofes naturales, inseguridad alimentaria y políticas de desigualdad, constituyen notables oportunidades para científicos e investigadores. Se trata de descifrar las consecuencias que una privación de alimentos durante etapas críticas del desarrollo uterino y postnatal, tienen sobre la salud en el individuo adulto.

### **1.4.- Modelos de subnutrición en animales**

La posibilidad de profundizar estos estudios en el ser humano es limitada. Para poder ampliar los conocimientos sobre las consecuencias de la restricción nutricional precoz, es necesario escoger modelos animales que permitan reproducir estas situaciones y observar los efectos negativos a largo plazo en órganos y tejidos. El interés principal de estos modelos es esclarecer las respuestas bioquímicas y fisiológicas del organismo frente a la malnutrición proteica o energética. Los animales de experimentación permiten examinar, de manera independiente, los efectos específicos que produce una manipulación de la dieta; en cambio, los estudios epidemiológicos no suelen aclarar los mecanismos de esos efectos.

Tradicionalmente, se han utilizado diversas especies de animales para llevar a cabo estudios de subnutrición: rata, ratón, cobaya, oveja, cerdo (Widdowson, 1971) y primate (Schlabritz-Loutsevitch & col., 2007).

Por su fácil manejo en el laboratorio y su amplio historial de resultados en cuanto a alteraciones posteriores a la subnutrición, para realizar este estudio se escogió la rata Wistar.

Por otra parte, existen distintos tipos de restricción nutricional; se pueden limitar los macronutrientes o los micronutrientes o efectuar una restricción global proteico-energética (Bertram & Hanson, 2001); esta última es la más frecuente en el ser humano subnutrido y por ello decidimos aplicarla en este estudio. Nos parece más ajustada a la realidad que otros modelos también extensamente publicados, como la disminución del flujo de sangre por la arteria uterina (Camprubí & col., 2009) o el incremento artificial del tamaño de la camada (Mendi, 1988).

Otros factores claves son: la duración de la subnutrición y el momento de inicio de la misma. Durante la gestación, existen periodos críticos de la programación precoz; lo son, por ejemplo, la implantación (Kumarasamy & col., 2005) y el desarrollo de la placenta (Godfrey, 2002). Cuando tiene lugar la organogénesis también se pueden producir alteraciones y algunos de los órganos pueden quedar dañados y experimentar una funcionalidad reducida. En las etapas finales de la gestación, el crecimiento fetal es máximo y se produce la maduración de los tejidos y sistemas para su adaptación a la vida extrauterina. Hay estudios demostrativos de que una restricción nutricional durante este periodo perinatal también puede producir daños a largo plazo (Nielsen & col., 2013; He & col., 2012). En base a ello, para este estudio se consideró la fase final de la gestación como punto de inicio para establecer el modelo de subnutrición. Por otra parte, se debe tener en cuenta que el periodo de plasticidad en las especies altriciales (p. ej. roedores y conejos) es largo, pues se trata de animales que siguen madurando postnatalmente y muchos de sus sistemas terminan de desarrollarse durante la lactancia. Por el contrario, los animales precociales (p. ej. humano y oveja) poseen una madurez fisiológica mayor en el momento del nacimiento (Romijn & col., 1991). En consecuencia, la nutrición materna de la rata durante el periodo postnatal también tendrá una importancia crítica en el desarrollo y crecimiento de los diferentes órganos y tejidos de la descendencia (Hales & Ozanne, 2003). Hay que tener en cuenta, finalmente, que el tipo de nutrición posterior al destete también influye sobre las funciones que se programaron en etapas precoces y puede amplificar, a largo plazo, sus consecuencias negativas (Ross & Desai, 2005).

### 1.5.- Subnutrición y homeostasis glucídica

Existen numerosas publicaciones demostrativas de que la subnutrición tiene efectos sobre diversos aspectos de la homeostasis glucídica. Muchos de esos trabajos se refieren, concretamente, a las repercusiones de esa condición sobre la secreción y/o acciones de la insulina. En general, aplicando diferentes modelos experimentales, se ha llegado a la conclusión de que la subnutrición crónica influye sobre la masa de células  $\beta$  pancreáticas y altera su capacidad funcional, produciendo hipoinsulinemia (Martín & col., 2004; Grace & col., 1990; Crace & col., 1989; Heard & Phil, 1966). Paradójicamente, esa restricción nutricional induce un incremento de la sensibilidad tisular a la insulina, lo que permite que la tolerancia a la glucosa, pese al déficit de hormona, se mantenga normal (Escrivá & col., 1992; Okitolonda & col., 1987).

Por otra parte, diferentes estudios epidemiológicos en humanos así como algunos trabajos experimentales sugieren con firmeza que cuando la subnutrición precoz es seguida por una rehabilitación nutricional con dietas excesivas (p. ej. hipercalóricas) *ad libitum*, el riesgo de obesidad está incrementado (Misra & Khurana, 2008). A su vez, la obesidad está asociada a la diabetes de tipo II, como es bien sabido. Dado que el presente trabajo está estrechamente relacionado con esta problemática, resumiremos a continuación los aspectos actuales más relevantes de la misma.

### 1.6.- Diabetes de tipo II y subnutrición precoz

La diabetes de tipo II es una enfermedad heterogénea cuya expresión depende de múltiples factores genéticos y ambientales. Aparece más frecuentemente en personas adultas y se caracteriza por una resistencia a la insulina, que produce hiperglucemia. Actualmente, esta enfermedad ha empezado a debutar a edades cada vez más tempranas, hasta el punto de afectar a niños y jóvenes, generando lo que ya se considera prácticamente como una epidemia (Rosenbloom & col., 1999). Además de los factores genéticos que predisponen a padecer diabetes de tipo II, el factor ambiental que más significativamente incrementa el riesgo para desarrollar esta enfermedad es la obesidad. Se ha llegado a introducir el término “diabesidad” (Astrup & Finer, 2000) para referirse a este fenómeno.

Sin embargo, paradójicamente hay numerosos estudios que relacionan esta enfermedad con la subnutrición precoz (Harder & col., 2007). Como se ha citado en la sección 1.2 de esta Introducción, según la hipótesis del “fenotipo ahorrador” postulada

por Hales & Barker en 1992, existe una inadecuada respuesta metabólica por parte del individuo adulto que estuvo sometido a un ambiente intrauterino desfavorable (Fig. 2). Por otra parte, la hipótesis del “genotipo ahorrador” postula la transmisión hereditaria de una serie de genes destinados a favorecer una reserva de sustratos, desde tiempos ancestrales en que la escasez de alimentos era habitual y la actividad física era más alta (Neel, 1962). Con el cambio en el tipo de nutrición y el estilo de vida actuales, la presencia de genes “ahorradores” no resulta apropiada. Las dos hipótesis se complementan para explicar esta epidemia de diabetes de tipo II que se ha establecido en la sociedad moderna (Yajnik, 2004).

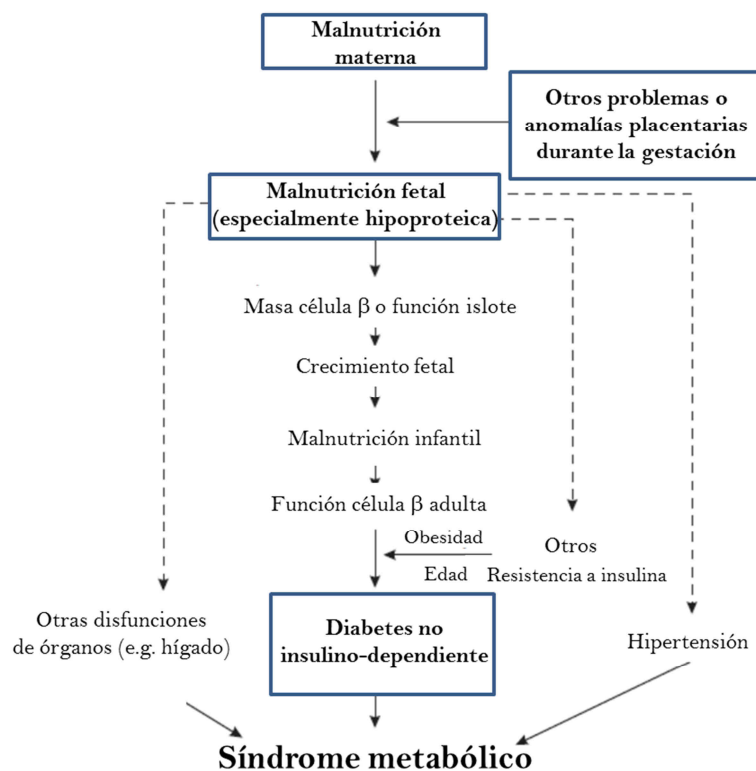


Fig. 2. Representación original del diagrama del fenotipo ahorrador. (Adaptado de Hales & Barker, 2001).

La diabetes de tipo II genera un gasto sanitario de enormes proporciones debido, fundamentalmente, a las complicaciones crónicas asociadas (enfermedades cardiovasculares, hiperlipidemia, etc.). Los países desarrollados y los que están experimentando un rápido crecimiento socio-económico son los que presentan la mayor prevalencia de esta enfermedad. Al mismo tiempo, las cifras de muerte por las complicaciones asociadas están aumentando especialmente en los países subdesarrollados (Aje & Miller, 2009). Brandle & col. calcularon un factor por el que multiplicar el coste

de un paciente de diabetes de tipo II considerando cada complicación añadida. Los pacientes que sufren patologías cardiovasculares requieren tratamientos adicionales muy costosos e incluso hospitalización (Brandle & col., 2003). A la vista del gran impacto social y económico que genera la diabetes, su prevención y las estrategias para evitar las complicaciones se han convertido en objetivos prioritarios para la comunidad sanitaria y científica.

## 2.- Sistema Nervioso Central y subnutrición

La subnutrición precoz puede conducir a un desarrollo anómalo del cerebro. Éste crece rápidamente desde la 10<sup>a</sup> hasta la 18<sup>a</sup> semana de la gestación, en el caso del ser humano, y se sigue desarrollando hasta los 2 años de edad. Si la restricción alimentaria tiene lugar durante estos periodos cruciales, puede tener consecuencias graves sobre el crecimiento del Sistema Nervioso Central (SNC). Se afectan no sólo las neuronas, sino también las células gliales, alterándose el correcto desarrollo de la mielina (Brown & Pollit, 1996). A pesar de todo ello, el impacto de la subnutrición precoz sobre el SNC ha sido relativamente menos estudiado. En algunos trabajos se ha investigado el efecto de esa condición sobre ciertas patologías mentales y sobre las actividades intelectuales superiores. En cuanto a las primeras, se ha concluido que existe mayor riesgo de padecer esquizofrenia (Susser & col., 2008; St Clair & col., 2005) y otras alteraciones psíquicas, como conducta antisocial y agresiva (Liu & Raine, 2006) y depresión (Susser & col., 1998). En cuanto a las actividades intelectuales superiores, se trata de una cuestión menos clara. En animales de experimentación sí se ha comprobado que la subnutrición produce déficits en la capacidad de atención, aprendizaje y memoria (Tonkiss & col., 2000; Almeida & col., 1996). No es fácil, sin embargo, estudiar esta cuestión en niños subnutridos, pues suelen provenir de ambientes socio-económicamente desfavorables y éstos influyen en la capacidad intelectual. El hambre, como sensación, incapacita y limita los recursos psicosomáticos, reduciendo la actividad física y mental. En algunos estudios sí que se ha demostrado que los niños subnutridos presentan altas tasas de hiperactividad y déficit de atención, por lo que exhiben mayores dificultades en el aprendizaje (Ivanovic & col., 2002).

## 2.1.- Acciones de la insulina sobre el SNC

La insulina ejerce acciones sobre el cerebro porque interviene en la bioquímica del SNC, contrariamente a lo que se postulaba hace unos años. Se ha demostrado que esta hormona atraviesa la barrera hematoencefálica por medio de un transportador. Los primeros estudios en los que se comprobó esta capacidad fueron los de Elgee y Haugaard (Elgee & col., 1954; Haugaard & col., 1954). Posteriormente, estas investigaciones se confirmaron con los análisis de insulina exógena marcada radiactivamente, que pusieron de manifiesto un transporte de la hormona a través de la barrera hematoencefálica mediante un mecanismo dependiente de saturación (Baura & col., 1993; Schwartz & col., 1992). El receptor de insulina (IR) se encuentra distribuido por todo el cerebro, siendo especialmente abundante en el bulbo olfatorio, corteza cerebral, hipotálamo, hipocampo y cerebelo (Wozniak & col., 1993; Havrankova & col., 1978). Una característica común de las regiones ricas en IRs es que se trata de campos con abundantes conexiones sinápticas y arborizaciones dendríticas (Werther & col., 1987). En comparación con las células gliales, los receptores de insulina (IR) son más abundantes en las neuronas (Unger & col., 1989) y sus niveles van disminuyendo con la edad, lo que indica que existe una asociación entre la señal insulínica y el envejecimiento (Bosco & col., 2011; Chung & col., 2002). Cuando la hormona llega a los receptores del SNC, se desencadenan vías de señales idénticas a las bien caracterizadas en tejidos periféricos.

Las funciones que ejerce la insulina en el SNC son variadas, siendo las más importantes las relacionadas con la ingesta y el equilibrio energético (en los centros hipotalámicos del hambre y la saciedad) (rev. por Plum & col., 2006) así como con las funciones cognitivas (en la corteza cerebral).

En general, los efectos de esta hormona en el SNC son contrarios a los que produce en los tejidos periféricos. Por ejemplo, induce un incremento de los niveles de glucosa en sangre y una disminución de la ingesta y del peso corporal. Además, actuando sobre el SNC, la insulina conduce a una disminución de su concentración en sangre (rev. por Banks & col., 2012). Por otra parte, tras inyecciones i.c.v. a corto y a largo plazo, se ha observado únicamente un discreto estímulo sobre el metabolismo energético cerebral, en estudios llevados a cabo en ratas (Figlewicz & col., 1995). La insulina también está íntimamente conectada con otros péptidos cerebrales que actúan en vías específicas, como el circuito de recompensa (Figlewicz, 2004; Gosnell & col., 1986). Finalmente, muchos estudios sugieren que la insulina ejerce funciones como factor de crecimiento en

el SNC: está implicada en la sinaptogénesis, proliferación y arborización dendrítica (Nelson & col., 2008).

Se ha demostrado en numerosas publicaciones, referidas tanto a animales como a humanos, que la insulina puede actuar sobre las funciones cognitivas. Por ejemplo, está implicada en los procesos que regulan la memoria (Benedict & col., 2004). No es extraño pues, que el deterioro de las acciones hormonales en el SNC se asocie con enfermedades cuyo síntoma principal es la pérdida de memoria, como ocurre en la enfermedad de Alzheimer. Además, la administración de insulina enlentece el desarrollo de la enfermedad y mejora la memoria en estos pacientes (Craft, 2007). Algunos autores denominan “diabetes de tipo III” a esta patología neurológica. La insulina también está implicada en el riesgo de padecer depresión y otras alteraciones de la conducta, como se ha visto en diabéticos de tipo II (Awad & col., 2004). Otros estudios realizados en niños diabéticos de tipo I, ponen de manifiesto la mejora de su rendimiento escolar y su comportamiento al comenzar a recibir tratamiento con insulina (Biessels & Gispen, 2005). Todas estas observaciones y datos indican que la insulina actúa sobre la capacidad cognitiva.

### **2.2.- Requerimientos energéticos de las células nerviosas**

A pesar de las importantes acciones directas que la insulina ejerce sobre el SNC, la captación de glucosa por el tejido nervioso no está regulada por esta hormona, al contrario de lo que ocurre en otros tejidos periféricos. Todos los transportadores de glucosa de las células cerebrales: GLUT-1 (presente en los astrocitos), GLUT-3 (en las neuronas) y GLUT-5 (presente principalmente en las células de la microglía) son independientes de la insulina (McEwen & Reagan, 2004). Mediante el GLUT-1 y por difusión facilitada, el monosacárido es transportado desde los capilares sanguíneos hacia el cerebro (Oldendorf, 1971).

La glucosa constituye el principal sustrato energético de las células nerviosas. Sin embargo, durante periodos de ayuno prolongado éstas pueden utilizar los cuerpos cetónicos y el lactato (White & Venkatesh, 2011; Pardridge, 1998) como alternativa (Robinson & Williamson, 1980). Se trata de la recuperación de una capacidad propia de las etapas precoces del desarrollo, como se explica a continuación.

### 2.2.1.- Sustratos energéticos a lo largo del desarrollo

El tipo de sustratos metabólicos utilizados por el cerebro va cambiando en función de la etapa del desarrollo. *In utero* depende exclusivamente de la glucosa. En etapas tempranas, el lactato tiene gran importancia, especialmente en el nacimiento. Después aumenta el uso de cuerpos cetónicos y glucosa, a lo largo de la lactancia. Tras el destete, el metabolismo cerebral depende exclusivamente de la glucosa, en condiciones normales. Estos cambios en el requerimiento de sustratos están acompañados de alteraciones en su disponibilidad, en su transporte y en las actividades de las enzimas implicadas en su producción y/o utilización (Prins, 2008).

Todo ello se conoce particularmente bien en la rata. Durante la lactancia de este roedor, en su hígado están incrementadas las enzimas productoras de cuerpos cetónicos y por eso presenta altos niveles circulantes. También posee un número mayor de transportadores en la barrera hematoencefálica (Booth & col., 1980). Durante el periodo de utilización máxima de estos sustratos, la lactancia, la capacidad del cerebro para captar hidroxibutirato es seis veces superior a la que tiene el órgano adulto (Cremer & col., 1976; Hawkins & col., 1971). Tras el destete, se produce un descenso de la concentración de cuerpos cetónicos en sangre y la capacidad para captarlos disminuye porque se produce una regulación negativa de los genes que transcriben transportadores de monocarboxilatos.

Los cambios en el metabolismo de la glucosa durante el desarrollo son más graduales. En el nacimiento, la glucemia es baja; sin embargo, aumenta progresivamente hasta el día postnatal 10, en el que alcanza el nivel propio del adulto. En cuanto a los transportadores de glucosa (GLUT1 y GLUT3) y las actividades de las enzimas de la glucólisis, ese nivel no se alcanza en el cerebro hasta el día postnatal 30 (Vannucci & Simpson, 2003; Nehlig & col., 1987; Leong & Clark, 1984).

Por otra parte, existen diversos estudios en los que se han demostrado efectos neuroprotectores de los cuerpos cetónicos. Entre otros, mejoran la bioenergética celular, ejercen acciones antioxidantes y anti-inflamatorias y tienen propiedades antiapoptóticas (Maalouf & col., 2009; Veech, 2004). Cabe indicar, finalmente, que el metabolismo de los cuerpos cetónicos en el SNC humano tiene características similares a las que se han observado en los roedores. Además, son sustratos claves cuando se produce un daño cerebral; hay, incluso, intentos de minimizar esas lesiones mediante su administración terapéutica (rev. por White & Venkatesh, 2011).

La proteína quinasa AMPK (*5'-Adenosine monophosphate-activated protein kinase*) es un sensor del estado energético celular. Se trata de un heterotrímero compuesto por una subunidad catalítica  $\alpha$  y dos subunidades regulatorias,  $\beta$  y  $\gamma$ . Se han descrito dos isoformas de cada una de ellas ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$  y  $\gamma 2$ ). La composición de las subunidades es diferente en cada tejido y en cada célula. La AMPK fosforila numerosas proteínas implicadas en la regulación del metabolismo energético como son: HMG-CoA reductasa, acetil-CoA carboxilasa, hormona sensora de lipasa, creatina kinasa y glucógeno sintasa. Como se ha indicado, esta kinasa ejerce una función fundamental en la adaptación de las células a la escasez energética. Cuando la AMPK se activa, las vías anabólicas como la síntesis de glucógeno, colesterol y ácidos grasos se inhiben, para reducir la utilización de ATP. Además, se inician una serie de procesos para compensar el déficit energético, como son: aumento de la captación de glucosa, de la glucólisis y de la oxidación de los ácidos grasos, para mantener unos niveles de ATP adecuados. La activación de la AMPK ocurre mediante un complejo mecanismo a través de AMP que implica cambios alostéricos así como en el estado de fosforilación (rev. por Culmsee & col., 2001).

Dado que el cerebro tiene una alta tasa metabólica y es al mismo tiempo muy sensible a cambios en los suministros de oxígeno y energía, la función de la AMPK es fundamental para la supervivencia neuronal. De hecho, se ha probado que la AMPK promueve la supervivencia celular bajo condiciones de disponibilidad de energía reducida (rev. por Culmsee & col., 2001).

### **2.2.2.- Origen hepático de los cuerpos cetónicos**

La cetogénesis es un proceso mitocondrial por el que el acetil-CoA, derivado principalmente de la beta oxidación de los ácidos grasos, se introduce en la vía HMG-CoA y a través de cuatro reacciones (Fig. 3) se convierte en acetoacetato y beta-hidroxibutirato, comúnmente llamados cuerpos cetónicos porque pueden originar acetona (Hegardt, 1999).

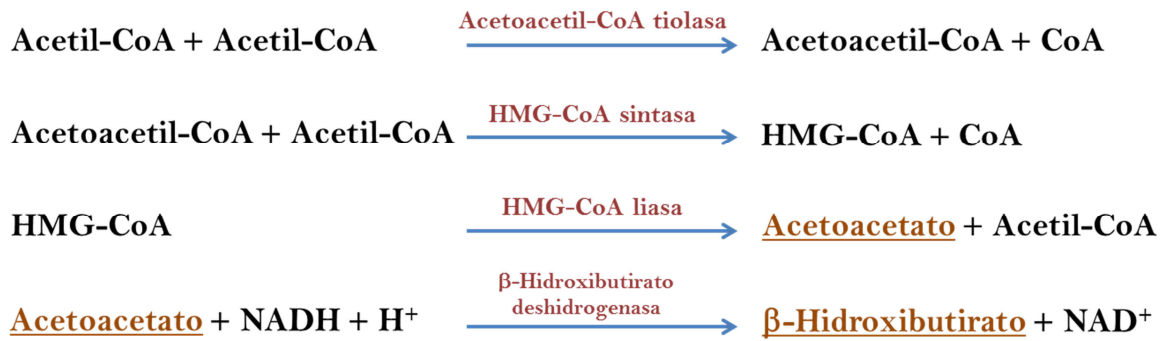


Fig. 3. Reacciones enzimáticas de la cetogénesis. Adaptada de Hegardt, 1999.

La cetogénesis se produce fundamentalmente en el hígado pero también ocurre en el intestino de mamífero durante la lactancia y, en menor proporción, en el riñón y en los astrocitos de la corteza cerebral del neonato (Cullingford & col., 1998; Vázquez & col., 1998; Thumelin & col., 1993; Hahn & Taler, 1987). El ayuno y la lipólisis inducen este proceso que puede intensificarse en la diabetes. En el paso de la condición alimentación-ayuno, la utilización de glúcidos y la síntesis de ácidos grasos se inhiben y se reemplazan por la oxidación de los ácidos grasos, proceso previo a la cetogénesis. Es decir: el inicio de esta vía depende del estado metabólico del organismo y su control depende de la entrada de ácidos grasos a la mitocondria, regulada por la carnitina palmitoil transferasa (CPT I) (Williamson & Whitelaw, 1978). Otro factor regulador de la cetogénesis es la expresión de los genes específicamente implicados en el proceso: CPT I (Mascaró & col., 1998) y HMG-CoA sintasa mitocondrial (Rodríguez & col., 1994). El importante papel de la CPT I fue estudiado por McGarry (rev. por McGarry & col., 1989) mientras que Williamson (Williamson & col., 1998) fue el primero en proponer que la HMG-CoA sintasa es la enzima limitante de la ruta cetogénica, tras estudiar la producción de acetoacetato en partículas de hígado sonicadas.

### 2.2.3.- Transportadores de cuerpos cetónicos: MCTs

Los ácidos monocarboxílicos como el piruvato o el lactato tienen una función muy importante en el metabolismo de las células. Para su transporte, los MCTs son esenciales y también se encargan del transporte de los derivados del metabolismo de la leucina, valina e isoleucina, así como del transporte de los cuerpos cetónicos: acetoacetato y beta-hidroxibutirato. Se trata de un transporte no dependiente de ATP, sino de gradiente. Se han encontrado hasta diez formas de MCTs. Cada una de ellas tiene una función específica y distinta expresión tisular. Por ejemplo, MCT1 y MCT4 se

expresan en la mayoría de tejidos; sin embargo, MCT3 se encuentra exclusivamente en el epitelio pigmentario de la retina (rev. por Halestrap, 2012).

El cerebro tiene la capacidad de ajustar la expresión de los transportadores de monocarboxilatos en función de sus requerimientos específicos de energía bajo distintas situaciones fisiológicas (rev. por Halestrap, 2012). Hay estudios que demuestran que la expresión de los MCTs, efectivamente, experimenta cambios. Por ejemplo, la expresión de MCT1 en las células endoteliales del cerebro es 25 veces mayor en el neonato que en el adulto (Vannucci & Simpson, 2003; Leino & col., 1999). De la misma forma, los mayores niveles de expresión de MCT1 (isoforma no endotelial) y MCT2 se alcanzan en torno al día 15 postnatal. Las neuronas expresan gran cantidad de MCT2 y esta isoforma tiene una gran afinidad para captar lactato y cuerpos cetónicos e introducirlos en las células cuando hay concentraciones bajas de estos metabolitos (Pellerin & col., 2005). Estos cambios en la expresión de algunos MCTs en diferentes tipos celulares coinciden con la formación de la barrera hematoencefálica. En el cerebro adulto tanto lactato como cuerpos cetónicos se consideran sustratos energéticos importantes en determinadas situaciones; por eso, la plasticidad en la expresión de los MCTs también es propia del cerebro adulto y va ligada a la disponibilidad de sustratos en la circulación. Una excepción es el MCT4, forma exclusiva de astrocitos, que sólo se modifica fisiológicamente en las etapas perinatales, mientras que en el cerebro adulto se altera solamente en algunas circunstancias patológicas (Pellerin & col., 2005).

En el hígado, las isoformas presentes de los transportadores de monocarboxilatos son distintas en cada especie. En la rata, la isoforma mayoritaria es el MCT1 y se encuentra fundamentalmente en la región periportal (Jackson & col., 1997).

### 3. Regulación de la ingesta

El control del peso corporal está basado en un equilibrio homeostático entre el gasto de energía y la acumulación de reservas. Sin embargo, así como hay muchos mecanismos que promueven la acumulación de grasa y conducen a una ganancia de peso, hay muy pocos que impulsen la pérdida (Druce & col., 2004).

En general, se puede hablar de dos sistemas de regulación de la ingesta: a) a corto plazo: previene la sobrealimentación en cada comida y los factores implicados son hormonas como la grelina o colecistoquinina (CCK); b) a largo plazo: se encarga del mantenimiento de las reservas de energía adecuadas, almacenadas en forma de grasa. Las

principales hormonas que participan en esta última regulación son: insulina y leptina, además de otros factores (Druce & col., 2004).

### 3.1.- Eje insulina-glucagón

Desde que Banting & Best descubrieron la insulina en los años 20 (Banting & Best, 1922), la investigación sobre esta hormona es exhaustiva. Es clave tanto para controlar el nivel plasmático de glucosa como para regular su captación por la célula. La insulina es sintetizada por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans. En humanos está codificada por un gen situado en el brazo corto del cromosoma 11 y su peso molecular es de 5808 Da. Está formada por dos cadenas polipeptídicas diferentes, la A, de 21 aminoácidos y la B, de 30, unidas entre sí mediante puentes disulfuro. Se sintetiza como proinsulina inactiva y mediante procesamientos proteolíticos se convierte en la molécula activa (Graham & col., 2008). El mecanismo de actuación de la insulina se detalla en la sección 3.4.1 de esta Introducción.

El glucagón es una hormona segregada por las células  $\alpha$ -pancreáticas. Su función es estimular la glucogenolisis y la gluconeogénesis, principalmente en los hepatocitos. Su secreción aumenta en situaciones de hipoglucemia o con el ejercicio físico y disminuye en situaciones de abundancia en la energética celular. Esta hormona está compuesta por 29 aminoácidos y junto con otros péptidos como GLP-1 y GLP-2, procede de las modificaciones postraduccionales del proglucagón, una molécula codificada por el gen *Gcg*. Las enzimas encargadas de realizar estas modificaciones son: la prohormona-convertasa 2 de las células alfa, en el caso del glucagón, y la prohormona-convertasa 1 de las células L del intestino, en el caso de los GLPs (Kieffer & Habener, 1999). Para llevar a cabo sus acciones, el glucagón se une a su receptor (Gcgr) (acoplado a proteína G), activando a la proteína Gs y promoviendo la actividad de la adenilato ciclasa, con el consecuente aumento en la producción de AMPc. También se activan otras señales como Epac, Torc, PKA y CREB (Koo & col., 2005; Jelinek & col., 1993; Wakelam & col., 1986). Así como fosfolipasa C (Aromataris & col., 2006), AMPK (Kimball & col., 2004), p38 MAPK y JNK (Chen & col., 1998); estos mecanismos aún no se conocen en profundidad. En la Fig. 4, se presenta una imagen esquemática de la vía de actuación de esta hormona.

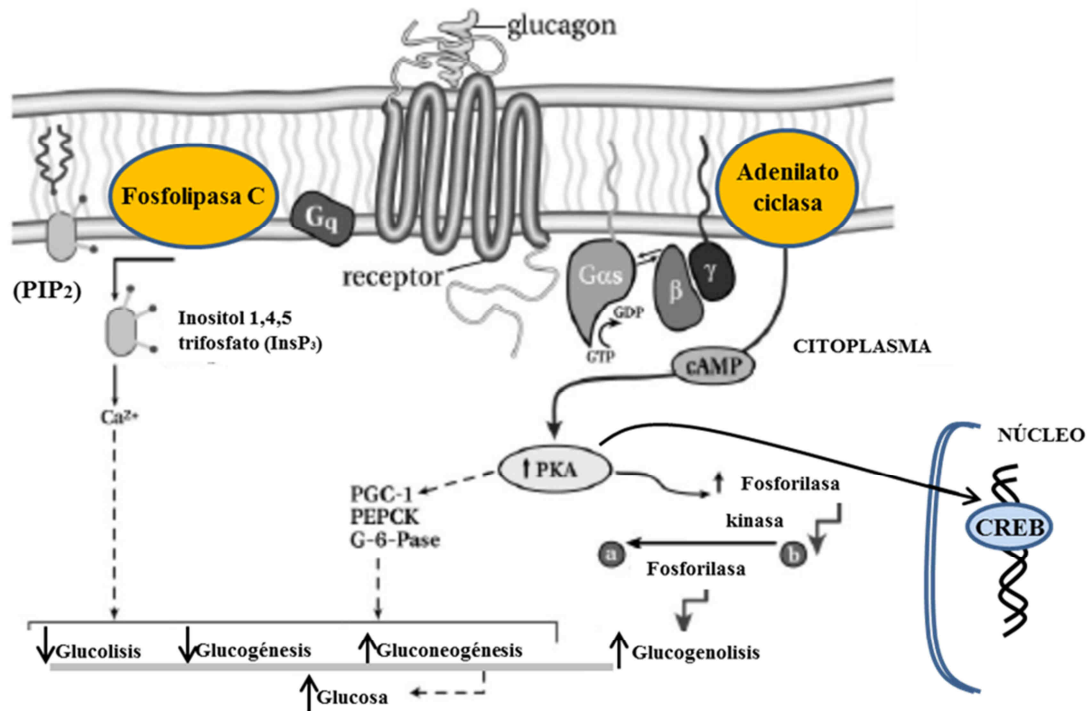


Fig. 4. Figura esquemática de la señalización del glucagón. Adaptado de Jiang & Zhang, 2003

La insulina y el glucagón son hormonas con efectos antagónicos. Actúan para lograr el mantenimiento de la glucemia, equilibrando la entrada de glucosa al torrente sanguíneo y la captación de ésta por los tejidos. Tras la ingesta de alimentos, la insulina se libera para acelerar la utilización de la glucosa y disminuir su concentración en la sangre. Para ello, esta hormona genera una serie de acciones: 1) estimula la captación del monosacárido por los tejidos sensibles a ella, como son: músculo esquelético y tejido adiposo; 2) aumenta el almacenamiento de la glucosa en forma de glucógeno en el músculo y en el hígado (glucogenogénesis), y en forma de triglicéridos en el tejido adiposo (lipogénesis); 3) inhibe la síntesis *de novo* de glucosa (gluconeogénesis). Durante el ayuno, disminuyen los niveles de insulina y aumenta la secreción de glucagón. Esto facilita los efectos contrarios: 1) liberación de glucosa, almacenada en forma de glucógeno, por parte del hígado (glucogenólisis); 2) degradación de triglicéridos por el tejido adiposo (lipólisis) y 3) activación de la gluconeogénesis (Tortora & Grabowsky, 2003).

Además del hígado, músculo y tejido adiposo, otros tejidos como el tracto gastrointestinal y la médula adrenal, actúan en conjunción con el páncreas endocrino para regular la homeostasis glucídica (Gerich, 2000). Por otra parte, muchos estudios han demostrado un importante papel del sistema nervioso sobre la función pancreática.

El páncreas endocrino se encuentra compleja y ampliamente innervado por el sistema autónomo. Principalmente a través de ramas del nervio vago (control parasimpático) y del esplácnico (control simpático), además de otros estímulos recibidos a través del eje entero-insular (Woods & Porte, 1974). Todas las señales aferentes son recogidas e integradas por los centros superiores del Sistema Nervioso Central para controlar la secreción pancreática de estas dos principales hormonas reguladoras de la glucemia, insulina y glucagón.

### 3.2.- Hipotálamo

Muchos desórdenes en el equilibrio alimenticio se han atribuido desde la mitad del siglo XX al hipotálamo. Es una región clave del Sistema Nervioso Central implicada en el control del apetito junto con otras como: el núcleo del tracto solitario, la amígdala, la corteza prefrontal y el área postrema.

El Sistema Nervioso Central recibe numerosas señales periféricas, fundamentalmente desde la mucosa gastrointestinal y el tejido adiposo. Estas señales son integradas a través del núcleo del tracto solitario y conducidas hasta los centros reguladores de la ingesta en el hipotálamo, para generar una respuesta (Fig. 5). Algunos de estos centros implicados directamente en el comportamiento alimentario son: el área hipotalámica lateral (HLA), donde se encuentra el área perifornical (PFA), y el núcleo paraventricular (PVN); éstas funcionan como “centro de hambre”. Por el contrario, el núcleo ventromedial (VMN) actúa como “centro de saciedad”. Es destacable el núcleo arcuato, centro de integración de señales para activar el hambre o la saciedad. Este núcleo contiene poblaciones de neuronas capaces de expresar neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos. Si el hipotálamo recibe señales activadoras del apetito, se estimularán las neuronas que expresan los péptidos orexigénicos: neuropéptido Y (NPY) y péptido relacionado con Agouti (AgRP), determinando la activación del centro del hambre (HLA y PVN). Por el contrario, si las señales recibidas son inhibitorias del apetito, se estimularán las neuronas que expresan los neuropéptidos anorexigénicos: proopiomelanocortina (POMC) y derivados de la hormona estimulante de  $\alpha$ -melanocitos ( $\alpha$ -MSH), así como el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART); con ello se activará el centro de saciedad (VMN) (Vettor & col., 2002).

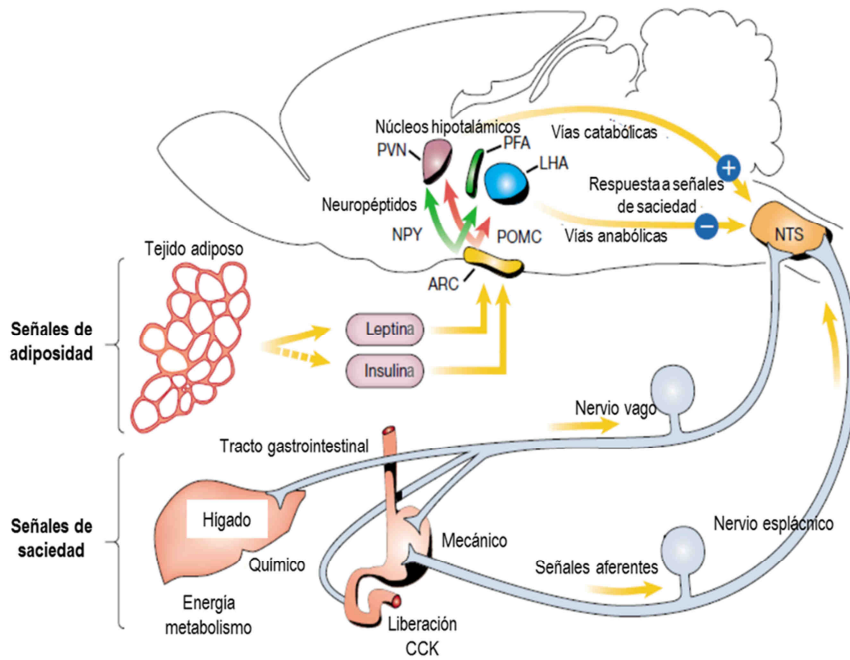


Fig. 5. Control neuroendocrino. Adaptado de Schwartz & col., 2000

### 3.3.- Factores reguladores del apetito a corto plazo

La grelina es la principal hormona que posee propiedades orexigénicas. Es un péptido de 28 aminoácidos, secretado fundamentalmente por las células endocrinas de la mucosa estomacal y liberado cuando el estómago está vacío. Por lo tanto, las concentraciones plasmáticas más altas coinciden con los periodos de ayuno. Las primeras dianas hipotalámicas sobre las que actúa la grelina son las neuronas orexigénicas que liberan NPY y AgRP al hipotálamo lateral (HLA) para generar efectos orexigénicos (Currie & col., 2005). También se pueden inhibir las neuronas del núcleo arcuato que expresan POMC y  $\alpha$ -MSH, que son las mediadoras del efecto anorexigénico en el núcleo ventromedial (VMN) (Konturek & col., 2004). Además, la grelina circulante disminuye la liberación de leptina y viceversa, la leptina reduce la concentración de grelina en plasma (Konturek & col., 2003). Por lo tanto, los efectos positivos de la leptina sobre la reducción del peso corporal se deben no sólo a su acción central sobre el hipotálamo, sino también a su acción inhibitoria de la liberación de la grelina.

Por otra parte, existen otras moléculas que actúan como estimuladores del apetito e intervienen en la regulación de la homeostasis energética, como la orexina A (OXA) y la orexina B (OXB) (Kirchgessner, 2002).

El principal péptido inhibidor de la ingesta a corto plazo es la colecistoquinina (CCK). Se localiza en la mucosa intestinal y en el plasma, en forma de numerosas variantes moleculares derivadas de las modificaciones post-traduccionales del gen *cck*. Esta hormona se segrega en el tracto gastrointestinal. La CCK y la distensión gástrica, transmitida a los receptores del nervio vago, son capaces de activar los péptidos anorexigénicos en el núcleo arcuato del hipotálamo para estimular el centro de la saciedad e inhibir el centro del hambre (Schwartz & col., 1999). Se han identificado otros péptidos intestinales que también actúan inhibiendo el apetito. Son el polipéptido pancreático (PP), el péptido YY (PYY) y el péptido parecido al glucagón (GLP1).

### 3.4.- Mecanismos de control de la ingesta a largo plazo: insulina y leptina

La insulina y la leptina son, probablemente, las dos hormonas principalmente implicadas en el control del equilibrio energético. No sólo por sus acciones periféricas, sino también por sus efectos en el SNC, los cuales se describen a continuación.

#### 3.4.1.- Vía de señales de la insulina

Probablemente la principal región del SNC sobre la que actúa la insulina es el hipotálamo, a donde llega a través de la sangre. El mecanismo por el que realiza sus acciones en el SNC es el mismo que en los tejidos periféricos; esta hormona conduce a la activación de diferentes vías de señales, que se resumen a continuación (Fig. 6).

#### Receptor de insulina y sus sustratos

El receptor de insulina es un tetrámero con dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$  ( $\alpha_2/\beta_2$ ). Funciona como una enzima alostérica en la que la subunidad  $\alpha$  inhibe la actividad tirosina kinasa de la cadena  $\beta$ . Se conocen dos isoformas del receptor cuya afinidad por la hormona y distribución tisular difieren. Cuando la insulina se une a la parte extracelular del receptor, la subunidad  $\alpha$  desreprime esa actividad tirosina kinasa y esto conduce a la autofosforilación en numerosos residuos de tirosina especialmente en las posiciones 1158, 1162 y 1163. Con ello, a continuación, se fosforilan tirosinas de los sustratos del receptor o IRSs. Se conocen cuatro formas de IRSs; sin embargo, IRS-1 e IRS-2 son las más ampliamente distribuidas en los tejidos. Las tirosinas fosforiladas de los IRSs actúan como sitios de unión de proteínas que contienen dominios SH2. Algunas de estas proteínas son moléculas adaptadoras, como la p85 (subunidad reguladora de la PI3K), Grb2 y Crk2 que activan proteínas G pequeñas. También se han identificado otras, como

la fosfotirosina fosfatasa SHP2 y la región citoplasmática de la tirosina kinasa Fyn (Saltiel & Kahn, 2001). Para los propósitos de este trabajo los efectos más importantes son los que se producen sobre PI3K, que se resumen a continuación.

### Vía PI3K/Akt

La PI3K (fosfatidil inositol 3 kinasa) tiene una función fundamental en las acciones de la insulina. Está constituida por dos subunidades: una catalítica (p110) y una reguladora (p85). Esta última posee dos dominios SH2 que, como se ha dicho, interaccionan con las regiones fosforiladas en tirosina de los IRSs. Se han identificado unas ocho isoformas de la p85 que derivan del *splicing* alternativo de al menos tres genes diferentes. Las funciones de estas isoformas no se conocen por completo, aunque se sabe que están implicadas en la activación de la enzima (Saltiel & Kahn, 2001). La interacción de p85 con los dominios SH2 de los IRSs induce la activación de la subunidad catalítica p110. Ésta cataliza la fosforilación del fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato, en la posición 3 del anillo del inositol para producir fosfatidil inositol (3, 4, 5) trifosfato (PIP3). Éste se une a dominios de homología plecstrina (PH), que contienen una gran variedad de proteínas, y esa unión produce la alteración de la actividad o de la localización subcelular de las mismas. Entre éstas se encuentran, por ejemplo, algunas AGC-quinasas, intercambiadores de guanina de la familia de GTPasas Rho y miembros de las TEC-quinasas. Uno de los principales blancos de PIP3 es la serina-treonina kinasa PDK1. Cuando este fosfolípido interacciona con el dominio PH de PDK1 se activa y ello conduce, a su vez, al reclutamiento hacia la membrana de la proteína Akt/PKB, así como a su fosforilación en la treonina 308, lo cual la activa parcialmente (Cross & col., 1995). El complejo mTORC2, del cual se tratará más adelante, cataliza otra fosforilación de Akt/PKB, en la serina 473. Estos cambios inducen la activación completa de la Akt (Gu & col., 2011; Sarbassov & col., 2005).

Otra proteína blanco de PDK1 es la PKC $\zeta$ ; ésta, a continuación, experimenta su activación completa mediante autofosforilación y despliegue estructural. Constituye una de las isoformas llamadas “atípicas” dentro de la familia de las PKC y ejerce un papel importante al intervenir en algunos efectos de la insulina, como la captación de glucosa por el músculo (rev. por Farese & Sajan, 2010).

La activación de Akt/PKB constituye un hecho crucial, porque está implicada en la regulación de múltiples funciones celulares. Presenta tres isoformas, cuya expresión tisular y localización subcelular mayoritaria son heterogéneas: Akt/PKB1 (ubicua,

citoplasmática), Akt/PKB $\beta$  (en los tejidos clásicamente sensibles a la insulina, asociada a mitocondrias) y Akt/PKB $\beta$  (en tejido nervioso nuclear) (Santi & Lee, 2010). Una de las principales proteínas fosforiladas por Akt/PKB es la GSK3.

La GSK3 fue denominada así porque se descubrió por vez primera como la causante de la fosforilación de la glucógeno sintasa. Aunque se ha conservado esa denominación, ahora se sabe que actúa sobre muchas otras proteínas, regulando las vías en las que participan. La gran variedad de efectos de la GSK3 es la causa de que sus alteraciones estén implicadas en la etiología de numerosas enfermedades: diabetes, inflamación, patologías cardiovasculares y del sistema nervioso, etc. (rev. por Takahashi-Yanaga, 2013). Esta kinasa presenta dos isoformas:  $\alpha$  y  $\beta$ . Las fosforilaciones de GSK3 $\alpha$  en la serina 21 y de la GSK3 $\beta$  en la serina 9 conducen a la inhibición de su actividad. Es destacable, pues, que la acción insulínica estimule las fosforilaciones de Akt/PKB y GSK3, produciendo la activación de la primera y la inhibición de la segunda. Por otra parte, la fosforilación de GSK3 también puede ser catalizada por otras kinasas (Grimes & Jope, 2001) (Fig. 6).

Otra de las proteínas blanco de Akt/PKB es mTOR. Se trata de una kinasa que interviene en la regulación de diversos procesos celulares, entre ellos: crecimiento, proliferación, síntesis proteica y biogénesis de ribosomas. mTOR forma parte de dos complejos distintos, denominados mTORC1 y mTORC2, en cuya composición intervienen otras proteínas; mTOR constituye la subunidad catalítica de esos complejos. Una de las principales acciones de mTORC1 es fosforilar a la proteína 4E-BP1; ésta se encuentra unida al factor de iniciación eIF4E y lo “secuestra”: impide que intervenga en la fase inicial de la traducción. Cuando 4E-BP1 se fosforila, el factor de iniciación queda libre y con ello se estimula la síntesis proteica (rev. por Dowling & col., 2010).

Otro sustrato de mTORC1 es P70S6K, que cataliza la fosforilación de algunas proteínas integrantes de los ribosomas, lo que tiene como consecuencia un aumento de la síntesis de proteínas y de la biogénesis ribosomal (Fig. 6).

El complejo mTORC1 también es capaz de modular negativamente la autofagia, proceso que se activa cuando se inhibe dicho complejo.

La actividad de mTORC1 es frenada por un complejo integrado por dos proteínas muy desiguales, llamado TSC1/TSC2. La Akt/PKB cataliza la fosforilación de ese complejo (como hacen otras kinasas), provocando su inhibición; en este efecto inhibitorio

está implicada Rheb, una proteína G. Así, de manera indirecta, la Akt/PKB actúa como regulador positivo de mTORC1.

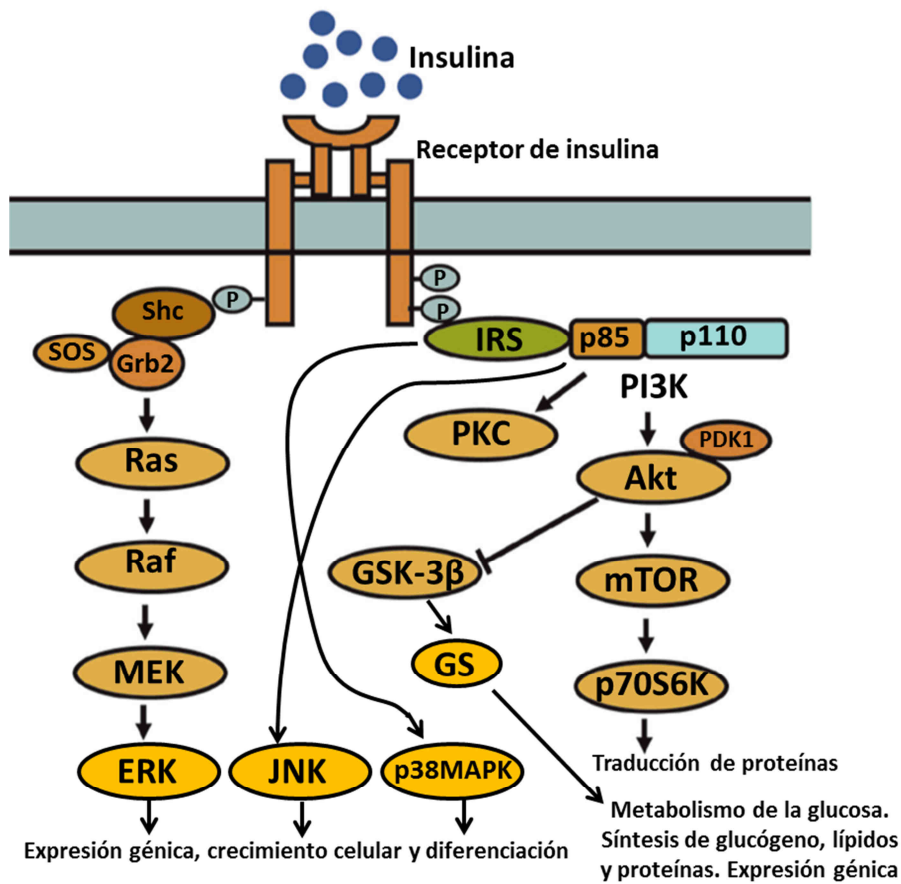


Fig. 6. Esquema de la señalización de la insulina. Adaptado de Huang & col., 2010.

### Vía de las MAPKs

Las MAPKs son una familia de serina-treonina kinasas que catalizan la fosforilación de múltiples proteínas y, de este modo, intervienen en la regulación de numerosas funciones celulares: expresión de genes, organización del citoesqueleto, homeostasis de sustratos, etc. Comprende cuatro subfamilias: ERK, ERK5, JNK y p38MAPK. El funcionamiento de cada uno de estos subgrupos implica, en el origen, la interacción de muchos ligandos con una amplia variedad de receptores (p. ej. tirosina-kinasas, como el receptor de insulina). A continuación se activan secuencialmente componentes de vías de señales que no se detallan en este resumen. A veces, esas vías implican a los IRSs; otras veces intervienen las proteínas adaptadoras SHC y SHP2 las cuales, por medio de SOS y Grb2, conducen la activación inicial hacia una secuencia

central, formada por las proteínas Ras, Raf y MEK a través de la cual se estimulan, finalmente, las MAPKs (rev. por Gehart & col., 2010) (Fig. 6).

### 3.4.2.- Vía de señales de la leptina

La leptina es un péptido, no glucosilado, de 16 KDa y se le considera como una hormona. Se produce fundamentalmente en los adipocitos blancos aunque otros tipos celulares (mucosa del estómago, músculo esquelético, epitelio mamario, placenta, médula ósea y pituitaria) también son fuentes de leptina (Ahima & Flier, 2000; Wauters & col., 2000). Tiene una estructura similar a la de otros miembros de la familia de citoquinas de IL-6. Sus efectos se producen en todos los tipos celulares que poseen su receptor; como citoquina, también actúa localmente de forma paracrina o autocrina. Después de su síntesis, la leptina es segregada a la sangre. Se ha considerado como un péptido anti-esteatótico y anti-lipogénico, puesto que disminuye el metabolismo no oxidativo de los ácidos grasos y, por tanto, protege frente a la lipotoxicidad (Unger, 2000). Su función primordial es actuar sobre los centros hipotalámicos (sobre todo en el núcleo arcuato) para intervenir en la homeostasis energética, pues inhibe la expresión de los péptidos orexigénicos NPY/AgRP y estimula la de los anorexigénicos POMC/CART (Cowley, 2001). Funciona, por lo tanto, como una señal de saciedad.

Las personas obesas tienen elevados niveles de leptina en plasma, proporcionales a su cantidad de grasa corporal, lo que parece contradecir el efecto saciante de la hormona. Sin embargo, esa situación conocida como “resistencia a la leptina” a veces se atribuye a la incapacidad de la hormona circulante para alcanzar sus dianas en el hipotálamo, debido a un transporte deficitario asociado, quizá, a algún fallo en la microcirculación (Banks & Farrell, 2003); otra posibilidad, es una alteración en la cascada de señalización (Munzberg & Myers, 2005). En ambas circunstancias, los efectos anti-obesigénicos de la hormona se ven limitados (Sahu, 2003).

Para llevar a cabo sus acciones, la leptina actúa a través de una cascada de señales, como se describe a continuación.

#### Receptor de leptina

El receptor de leptina (OBR) pertenece a la clase I de los receptores de citoquinas. Es una proteína que atraviesa la membrana. Su porción extracelular tiene cuatro dominios de fibronectina tipo III, así como restos de aminoácidos muy

conservados (Tartaglia & col., 1995). Su porción intracelular carece de actividad tirosina kinasa (Ghilardi & Skoda, 1997). Tiene seis isoformas que se generan por *splicing* alternativo del ARNm codificado por el gen *db*. Su región extracelular es similar en todas ellas; se diferencian fundamentalmente en la región intracelular así como en su función. Las isoformas OBRa, OBRc y OBRd tienen regiones intracelulares cortas de 34, 32 y 40 aminoácidos, respectivamente, y su función está relacionada con la internalización de la leptina en la célula para su posterior degradación (Chua & col., 1996). OBRe es un receptor soluble que carece de las regiones transmembrana e intracelular; se encuentra circulando por la sangre y no se produce por *splicing* alternativo, sino que parece ser generado a partir de los otros receptores. Tiene una función importante, pues la leptina se une a él con gran afinidad y está implicado en la regulación de los niveles plasmáticos de la hormona. Se ha visto que los individuos obesos tienen menos cantidad de OBRe (Ogier & al, 2002). La isoforma OBRf ha sido descubierta recientemente y no se conoce mucho sobre ella.

La isoforma OBRb se designa como “forma larga” del receptor; posee una región intracelular de 301 aminoácidos, lo que la convierte en la de mayor tamaño. También se trata de la isoforma funcional por excelencia, ya que es la única que contiene los residuos *consenso* necesarios para desencadenar la cascada de señalización de la leptina. Esta isoforma se expresa principalmente en el hipotálamo, aunque también en otros muchos tipos celulares como: pulmón, riñón, adipocitos, células endoteliales, músculo, hígado, islotes pancreáticos y otros (Bjørnbæk & col., 1997).

### Vía JAK/STAT

Cuando la leptina se une a la forma dimérica de OBRb, ésta experimenta un cambio conformacional que determina la asociación de la tirosina-kinasa citosólica JAK2, en regiones próximas a la membrana de cada subunidad del receptor (rev. por Denver & col., 2011) (Fig. 7). Entonces, las dos moléculas de JAK2 experimentan una autofosforilación cruzada que las activa; con ello, catalizan la fosforilación de tres restos de tirosina en el receptor: las que están situadas en las posiciones 985, 1138 y 1077. De este modo, en cada subunidad de OBRb, se originan tres centros de reclutamiento a los que se pueden unir proteínas que contengan dominios SH2. La consecuencia es que cada uno de estos centros se convierte en un punto de origen de vías diferentes, las cuales conducen a distintos efectos de la leptina:

- a) la fosfotirosina 985 es un punto de anclaje para SHC o para SHP2. Esta última es una tirosina-fosfatasa. Su asociación con OBRb determina su autofosforilación y su unión consecuente a Grb-2 y SOS, etapas previas -como se ha visto- a la activación de las MAPKs, especialmente ERK (Banks & col., 2000). Hay que señalar que la leptina también puede activar las vías de las MAPKs a través de isoformas cortas del receptor, es decir, de manera independiente de OBRb (Bjørnbæk & col., 1997).
- b) la fosfotirosina 1138 recluta STAT3, que es un factor de transcripción; esta proteína es crucial para mediar muchos de los efectos que la leptina ejerce sobre el metabolismo. La dos moléculas de STAT3 que se unen a OBRb se fosforilan mediante la actividad de JAK2, que permanece asociado al receptor, y se disocian de éste para formar un homodímero. Este último se transloca al núcleo, en donde regula la transcripción de varios genes (Imada & Leonard, 2000). Es muy importante indicar que entre estos genes se encuentra el que codifica para SOCS3, una proteína que funciona como regulador negativo de esta vía. Concretamente, SOCS3 se une a JAK y bloquea su autofosforilación. La fosfatasa PTP1B también regula a la baja la vía, en este caso mediante la defosforilación de JAK2 (Bjørnbæk & Kahn, 2004).
- c) en la posición correspondiente a la tirosina fosforilada 1077 se une a STAT5, que evoluciona de manera similar a la descrita para STAT3: también experimenta dimerización y translocación al núcleo, en donde regula la expresión de otros genes, algunos de los cuales están relacionados con procesos oncogénicos.

### 3.4.3.- Interacción de las vías de señales de la insulina y leptina

En algunos de los efectos que causa la leptina, intervienen proteínas que también actúan como componentes de la vía de la insulina; es decir: las vías de ambas hormonas están conectadas, presentan puntos de confluencia y solapamiento. También pueden interactuar en un sentido inhibitorio. Los aspectos más destacables al respecto son los siguientes (Fig. 7):

- a) como ya se ha indicado, la leptina puede activar a las MAPKs, efecto también causado por la insulina.
- b) la proteína JAK2 fosforilada puede interactuar con los IRS-1/2, estimulándolos (Carvalhoira & col., 2005); en consecuencia, la leptina puede

activar la PI3K y las serina-treonina kinasas situadas a continuación, en coincidencia con la insulina.

- c) además de los efectos anteriores, que demuestran una sinergia en la actuación de las dos hormonas, la leptina también puede ocasionar efectos inhibitorios sobre las acciones de la insulina. El compuesto principal al respecto es SOCS3, que, como se ha visto, es inducido por la leptina. SOCS3 interfiere en las acciones de la hormona pancreática, ya que puede unirse a su receptor e inhibir la fosforilación de los IRSs (Burgos-Ramos & col., 2011).

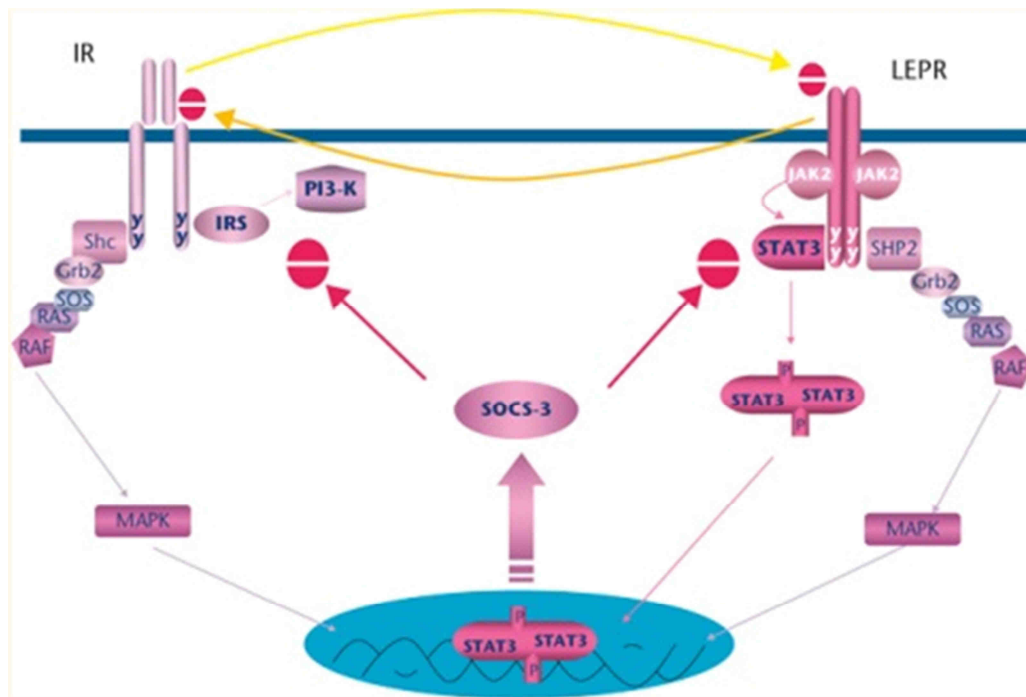


Fig. 7. Vía de la leptina y su interacción con la vía de la insulina. Adaptado de Taouis, 2011.

## 4.- Obesidad y homeostasis glucídica

### 4.1.- Epidemia de obesidad global

La obesidad es una enfermedad multifactorial causada por agentes genéticos y ambientales. Actualmente, existen en el mundo 1500 millones de adultos y 170 millones de niños que padecen sobrepeso u obesidad, según datos de la OMS. La prevalencia mundial de obesidad está aumentando y es tal la magnitud de este problema que incluso se ha adoptado el término de “globesidad” para referirse a él (Pietrabissa & col., 2012). Para el año 2050 se predice que el 50% de los adultos serán obesos. Las causas de esta epidemia de obesidad no se conocen por completo, pero sus consecuencias son evidentes:

dramático aumento de la diabetes de tipo II, incluso en la población infantil, y también de las enfermedades cardiovasculares.

En los países desarrollados, el incremento de la tasa de obesidad comenzó en la década de 1970, cuando las economías y los mercados iniciaron un desarrollo floreciente. La industria agrícola estadounidense empezó a producir maíz de manera masiva y los productos derivados de este cereal (galletas, pastas, sémolas, etc.) se vendían a bajo precio. Por otra parte, se introdujeron nuevos aditivos para aumentar el sabor de los alimentos. Un buen ejemplo es el jarabe de maíz rico en fructosa, hoy más comúnmente conocido como “azúcar de maíz”; éste fue utilizado de manera general por la industria alimentaria para edulcorar sus productos. Hoy se sabe que esta hexosa está relacionada directamente con el desarrollo de obesidad y resistencia a insulina. Además, se considera más adictiva que el propio azúcar (Forshee & col., 2007; Bray & col., 2004).

En los países en vías de desarrollo, la occidentalización de la dieta y la consecuente epidemia de obesidad han llegado más tarde; sin embargo, el consumo de la llamada “comida basura” a bajo coste se ha propagado rápidamente. En las últimas décadas, ha habido un crecimiento exponencial de la economía globalizada que ha conducido a un rápido desarrollo económico en esos países. Esto, unido al cambio en el estilo de vida, particularmente el sedentarismo, explica el aumento de las tasas de obesidad. Un fenómeno particularmente destacable es que una fracción significativa de personas que habían sufrido una condición de subnutrición crónica, de mayor o menor intensidad, han tenido acceso a este tipo de dieta occidentalizada, excesivamente calórica; esas personas también han desarrollado obesidad.

#### **4.2.- Modelos de sobrealimentación en animales: dietas de cafetería vs. dietas altas en grasa**

Para elucidar los mecanismos fisiológicos y bioquímicos implicados en el desarrollo de la obesidad, los investigadores han puesto a punto diversos modelos en animales. Por primera vez en 1976, Sclafani estableció un modelo que él mismo denominó “dieta de supermercado”. Consistía en la administración de una mezcla de alimentos humanos altamente palatables (ricos en azúcares y grasas) junto con el pienso estándar común de las ratas, consiguiendo que estos animales se volvieran obesos (Sclafani & Springer, 1976). Más tarde, estos modelos se han renombrado como “dietas de cafetería”. Se trata de patrones de alimentación que producen obesidad y síndrome

metabólico en los roedores (Sampey & col., 2011). Son métodos extensamente utilizados para estudiar la obesidad, la resistencia a la insulina y los mecanismos bioquímicos que las causan (Colombo & col., 2012; Rodríguez & col., 2004; Falcou & col., 1985; Rothwell & Stock, 1979). Con esos mismos objetivos también se emplean frecuentemente otros tipos de dietas que inducen obesidad. Se trata de mezclas comerciales que contienen un mayor porcentaje de calorías provenientes de la grasa, a costa de reducir la proporción de glúcidos (Buettner & col., 2011). Sin embargo, la variedad de alimentos altamente palatables que se incluyen en las dietas de cafetería, hacen que éstas se ajusten de un modo más preciso al patrón de alimentación occidental. De acuerdo con esto, en el presente estudio se eligió una dieta de este tipo, como se verá más adelante.

### **4.3.- Resistencia a insulina y obesidad**

La resistencia a insulina se caracteriza por una sensibilidad disminuida a esta hormona en sus principales órganos diana: tejido adiposo, hígado y músculo. En el tejido adiposo, esta hormona disminuye la lipólisis, reduciendo la salida de ácidos grasos libres a la sangre; en el hígado, la insulina inhibe la gluconeogénesis y estimula la glucogenosíntesis, actuando sobre las actividades enzimáticas clave de estas vías; en el músculo esquelético, aumenta la captación de glucosa estimulando la translocación del transportador GLUT4 a la membrana plasmática. Cuando existe resistencia a insulina, disminuyen todos estos efectos, lo cual conduce a la elevación de las concentraciones de ácidos grasos circulantes, acumulación de grasa ectópica, producción de una mayor cantidad de glucosa en el hígado y al establecimiento de un cuadro de hiperglucemia (Zeyda & Stulnig, 2009).

Como se ha indicado antes, la resistencia a la insulina se relaciona fundamentalmente con la obesidad, en particular, con la obesidad central o visceral (Levobitz, 2005). La liberación de ácidos grasos y otros productos derivados del tejido adiposo visceral a la circulación portal parece ser una de las principales causas de las alteraciones anteriores. Por otra parte, la hiperglucemia empeora la situación, por los propios efectos de la glucosa (glucotoxicidad) sobre la función de la célula beta pancreática (Yki-Jarvinen, 1992). La insulino-resistencia asociada con la disfunción de esta célula, conduce al desarrollo de la diabetes de tipo II, en el momento en que la hiperinsulinemia no es suficiente para compensar esa resistencia (Lillioja & col., 1993).

#### 4.3.1.- Mecanismos de resistencia a la insulina

Como se ha visto en la sección 3.4.1 de esta Introducción, la insulina ejerce sus efectos a través de una vía de señales compleja, en la que intervienen muchas proteínas. La intensidad de esa vía puede disminuir, apareciendo resistencia. Los mecanismos moleculares causantes de esa disminución son heterogéneos y aún no se conocen completamente. Las mutaciones inactivadoras del receptor son muy raras (rev. por Könnner & Brüning, 2012). Se conocen mejor las situaciones de resistencia derivadas de modificaciones de los IRSs, concretamente de IRS1/2, que representan un papel crucial en la etiología de los cuadros de insulino-resistencia. Las dos proteínas pueden experimentar fosforilaciones en serina, que atenúan la señalización de la vía disminuyendo las fosforilaciones en tirosina inducidas por esta hormona (Hotamisligil & col., 1996). Las serina-quinasas mejor conocidas que fosforilan IRS1 son: I kappa B kinasa beta (IKKbeta), c-jun N-terminal kinasa (JNK1) y otras MAPKs. Es destacable que algunas de ellas, como JNK son activadas por la propia insulina, indicando la existencia de un mecanismo de control negativo. Estas serina kinasas son mediadoras de vías de señales inflamatorias, lo que demuestra también la existencia de una interacción entre estas vías y las señales de la insulina.

En diferentes estudios se ha demostrado que una activación deficitaria de la PKC $\zeta$  por la insulina causa resistencia a la hormona, tanto en adipocitos (Sajan & col., 2004) como en músculo (Farese, 2002).

Los efectos de la insulina también pueden disminuir por la actuación de proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas) que catalizan la rápida defosforilación del receptor y los IRSs. Una de las PTPasas implicadas en cuadros de resistencia a la insulina es la PTP1B. Numerosas evidencias tanto *in vivo* como *in vitro*, demuestran que esta fosfatasa tiene un papel determinante en algunos de esos cuadros (rev. por Koren & Fantus, 2007).

Otras moléculas importantes que pueden frenar la vía de señales de la insulina son algunas citoquinas inflamatorias, como SOCS3, cuyo papel al respecto se ha indicado en la sección 3.4.3 de esta Introducción. Las proteínas SOCS son inducidas durante la inflamación y promueven la ubiquitinilación y degradación de los IRSs (Rui & col., 2002). Finalmente hay que mencionar el óxido nítrico (NO), molécula producida por la óxido nítrico sintasa (NOS). Su isoforma iNOS puede ser inducida por diversas citoquinas inflamatorias; por eso, la obesidad aumenta su expresión en los tejidos insulino-sensibles. El incremento de NO provoca insulino-resistencia, por mecanismos

todavía poco aclarados; al parecer se produce una S-nitrosilación de proteínas de la vía insulínica, como el receptor, IRSs y Akt/PKB (rev. por McConell & col., 2012; Kaneki & col., 2007). Ese cambio químico intensifica la degradación de estas proteínas (Sugita & col., 2005; Yasukawa & col., 2005).

#### 4.4.- Almacenamiento de la grasa

##### 4.4.1.- El tejido adiposo

La principal función del tejido adiposo es el almacenamiento de grasa cuando el individuo ingiere un exceso de calorías. Además, se encarga de la termorregulación y la protección mecánica del resto de órganos y tejidos. También se ha de tener en cuenta que el tejido adiposo es un órgano endocrino muy activo con una alta capacidad secretora (Blüher, 2012).

Existen, principalmente, dos tipos de tejidos adiposos: el marrón (BAT) (*brown adipose tissue*) y el blanco (WAT) (*white adipose tissue*). Este último se distribuye por todo el cuerpo y tiene una gran capacidad de expansión. Es un tejido muy heterogéneo constituido por múltiples tipos celulares: adipocitos, preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales e inmunitarias, nervios, vasos sanguíneos, etc.; siendo el adipocito la célula mayoritaria. Estas células contienen una gran vacuola de grasa en su citoplasma que desplaza al núcleo hacia el extremo opuesto (Cristancho & Lazar, 2011).

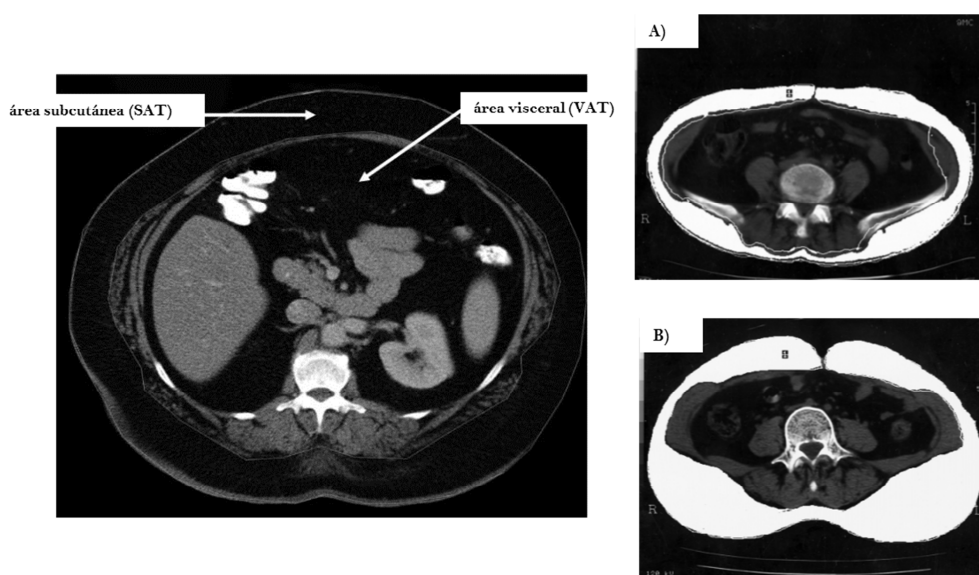


Fig. 8. Imágenes de tomografías computarizadas (TC) que muestran secciones transversales a nivel umbilical de pacientes diferentes. A) Tipología visceral de acumulación de grasa visceral. B) Tipología subcutánea de acumulación de grasa. Adaptado de Wajchenberg, 2000.

En función de su localización anatómica, existen dos tipos principales de tejido adiposo blanco: a) el llamado tejido adiposo visceral (VAT), situado en las cavidades del cuerpo que rodean los músculos abdominales; está compuesto por el omentum mayor y menor (zonas del peritoneo clasificadas según los diferentes órganos abdominales) y la grasa mesentérica; también existe una pequeña cantidad en la zona retroperitoneal y b) el tejido adiposo subcutáneo (SAT), que se localiza inmediatamente por debajo de la piel y en la parte superior de la musculatura abdominal (Wajchenberg, 2000). En la Fig. 8, se pueden apreciar imágenes de tomografías computarizadas de dos pacientes, cada uno con una distribución prioritaria del tejido adiposo blanco.

#### **4.4.2.- Disfunciones del tejido adiposo**

Cuando el organismo recibe un plus de calorías de manera continua y el equilibrio entre gasto y aporte calórico se altera, cambian la capacidad de almacenamiento y la distribución del tejido adiposo blanco, produciéndose una expansión del tipo visceral (Blüher, 2009). Además, aumenta su capacidad secretora, que de por sí es superior a la que posee el tejido adiposo subcutáneo (Baglioni & col., 2012). Como consecuencia, segrega una gran cantidad de citoquinas y quimoquinas inflamatorias como son: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 y MCP-1, algunas de ellas capaces de actuar sobre la señalización insulínica (Sartipy & Loskutoff, 2003; Rotter & col., 2003; Amrani & col., 1996; Hotamisligil & Spiegelman, 1994). Además, los mecanismos de lipólisis se ven afectados de modo que se liberan grandes cantidades de ácidos grasos a la circulación sanguínea, contribuyendo a la inducción de resistencia a la insulina. Por todo ello, la expansión del tejido adiposo blanco visceral está asociada a un incremento del riesgo de patologías como la diabetes de tipo II y enfermedad cardiovascular, además de aumentar la mortalidad derivada de otras enfermedades (rev. por McQuaid, 2011).

No se conocen bien las causas de la iniciación del proceso inflamatorio en los estados de obesidad. Puede que ello esté relacionado con otras alteraciones que se produzcan al mismo tiempo en el tejido adiposo, como puede ser un estado de hipoxia (Baglioni & col., 2012). Es bien sabido que una buena irrigación del tejido adiposo es necesaria para su correcto funcionamiento. De hecho, se ha sugerido que el subcutáneo está más irrigado y por eso responde mejor a la insulina (Baglioni & col., 2012). La obesidad puede estar relacionada, por tanto, con una angiogénesis insuficiente, que implique una oxigenación escasa en el tejido adiposo visceral (Sun & col., 2011; Pasarica & col., 2009). Además, la hipoxia se considera como un factor que contribuye a la muerte

de los adipocitos, lo cual a su vez está relacionado con el reclutamiento de macrófagos (Ye, 2009).

Por otro lado, la pérdida de grasa en ciertas zonas del tejido adiposo o la inadecuada distribución de ésta, llamada lipoatrofia o lipodistrofia, puede también causar alteraciones metabólicas como resistencia a insulina y diabetes de tipo II. Si el tejido adiposo visceral o intraabdominal se desarrolla rápidamente en detrimento del subcutáneo, éste último puede sufrir estos procesos de lipoatrofia. El tamaño del adipocito disminuye, aumentan los procesos apoptóticos y se reduce la expresión de genes implicados en la adipogénesis, como: PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  y SREBP-1 (Feng & col., 2013). Además, los niveles de adiponectina pueden disminuir, contribuyendo al progreso de insulino-resistencia. La lipoatrofia se ha estudiado principalmente en pacientes afectados por el virus del SIDA (VIH), así como en ciertas alteraciones genéticas muy raras, como el síndrome de Lawrence y el de Barraquer-Simons; en ambos casos, los pacientes sufren pérdida de la grasa subcutánea y presentan esteatosis hepática, hipertrigliceridemia y diabetes (Misra & Garg, 2003).

### **4.4.3.- Infiltración de grasa ectópica en los tejidos**

Cuando los adipocitos han perdido la capacidad para captar y liberar ácidos grasos de manera adecuada, éstos se redirigen hacia otros tejidos, como músculo esquelético, hígado, páncreas y corazón. La expresión “grasa ectópica” hace referencia a este exceso de lípidos depositado en tejidos no destinados a su almacenamiento (Britton & Fox, 2011). Las consecuencias derivadas de la acumulación de esta grasa ectópica dependen del tipo de tejido, aunque los mecanismos por los que se produce son similares. Debido al suministro excesivo de ácidos grasos, la mitocondria pierde su capacidad para oxidarlos y se almacenan en forma de: ceramidas, acil-CoA de cadena larga, diacilglicéridos y triglicéridos. Estas formas van a causar daño en los tejidos, pues inducen una activación sostenida de las serina-treonina kinasas. Esta situación, como se ha indicado en la sección 4.3.1 de esta Introducción, provoca la atenuación de la vía de señales insulínica. Además, en el hígado, la disminución de la vía de la insulina ocasiona un aumento en la producción de glucosa y una disminución de su captación, con lo que aumenta la glucemia, pudiendo aparecer diabetes de tipo II (Snel & col., 2012).



## **II. OBJETIVOS**



## II. OBJETIVOS

Como se ha indicado en la sección 2 de la Introducción, la subnutrición precoz puede afectar al SNC en desarrollo y repercutir después negativamente sobre algunas de sus funciones. Los mecanismos bioquímicos subyacentes aún no están bien establecidos, de modo que los resultados nuevos que se aporten en esta línea serían, quizá, provechosos. Un desequilibrio de los sustratos que sostienen el desarrollo del SNC (glucosa y cuerpos cetónicos) podría ser, sin duda, causa de alteraciones. En el hígado, la insulina y el glucagón (que ejercen importantes efectos sobre este órgano) desempeñan papeles claves para que el cerebro en crecimiento “acelerado” tenga acceso a una proporción adecuada de esos sustratos.

En este trabajo hemos aplicado un modelo de subnutrición perinatal en rata para estudiar cómo influye esta condición sobre algunos de esos aspectos durante la lactancia, en el hígado y en la corteza cerebral. Hoy está admitido que algunas perturbaciones del metabolismo establecidas en las etapas de inmadurez constituyen la base de patologías a largo plazo, como hemos apuntado en la sección 1.2 de la Introducción.

En base al planteamiento anterior, los dos primeros objetivos de esta Tesis son los siguientes:

- ❖ **1.-** Investigar los efectos que la subnutrición proteico-calórica precoz tiene sobre los perfiles endocrino y metabólico en el hígado de las ratas lactantes, específicamente en cuanto a las respuestas de este órgano a la insulina y glucagón.
- ❖ **2.-** Analizar el impacto de dicha subnutrición sobre la vía de señales de la insulina en la corteza cerebral de la rata lactante.

En la sección 1 de la Introducción se expone el hecho de que dentro de la población de obesos presente en el mundo (problema de salud pública de enorme relevancia), existe un grupo muy amplio de personas que experimentaron subnutrición (de mayor o menor severidad) antes de llegar al sobrepeso. Diversos estudios epidemiológicos sugieren que ese antecedente, paradójicamente, está conectado con la obesidad ulterior. En este estudio hemos completado el modelo de subnutrición precoz, prolongándolo hasta la vida adulta. Entonces, las ratas restringidas se han transferido a

una dieta moderadamente hiperlipídica. El propósito es comprobar la influencia de la subnutrición previa sobre la regulación de la ingesta y sobre algunos efectos metabólicamente nocivos de la dieta mencionada. Con ese propósito, el tercer objetivo planteado en esta Tesis ha sido el siguiente:

- ❖ **3.-** Determinar la influencia de la subnutrición precoz y crónica sobre las consecuencias de una dieta hiperlipídica en ratas adultas: su impacto sobre la regulación hipotalámica de la ingesta, distribución del tejido adiposo blanco, lipemia, grasa ectópica y sensibilidad global a la insulina.



## **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## III. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.- Animales y dietas

En este trabajo se han empleado ratas de la raza Wistar obtenidas del Animalario de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y posteriormente criadas en el estabulario del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia. Se ha llevado a cabo un riguroso control de la nutrición de los animales en todas las etapas: gestacional, lactante y adulta. Se expusieron a una temperatura constante entre 22-24 °C y a un ciclo automático de 12 horas de luz-oscuridad. El inicio de la gestación fue establecido al día siguiente del apareamiento mediante la observación, por frotis, de la presencia de espermatozoides en la vagina de la rata. La gestación se confirmó a los 14 días por palpación abdominal. El día del nacimiento todas las camadas se uniformaron y se dejaron 8 crías hembras por cada madre. Las ratas se destetaron a los 25 días de vida y fueron agrupadas en jaulas que contenían de 2 a 3 animales.

Todos los procedimientos que se realizaron en esta Tesis fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad Complutense de Madrid.

#### 1.1.- Pautas de nutrición

Se han estudiado ratas lactantes en distintas etapas y ratas adultas de 70 días y 9 meses de vida. Estos animales se han mantenido bajo diferentes condiciones nutricionales, utilizando dos tipos de alimento:

- a) pienso estándar. Adquirido del comercio.
- b) fórmula hipercalórica. Confeccionada en nuestro propio laboratorio. Será designada como “dieta de cafetería”, denominación ampliamente admitida.

En todos los casos, los animales dispusieron de agua sin limitación.

#### 1.2.- Composiciones del pienso estándar y la dieta de cafetería

El alimento estándar proporcionado a las ratas fue el pienso *A04 Mantenimiento Rata/Ratón* de SAFE (Scientific Animal Food & Engineering) suministrado por Panlab S.L.U (Barcelona). Se presenta en forma de porciones prensadas cuya composición general, por cada 100 gramos, es la siguiente:

Proteínas	16 g
Glúcidos	56 g
Celulosa	4 g
Lípidos	3 g
Fibras	4 g
Vitaminas y minerales	5 g
H <sub>2</sub> O	12 g

**Pienso A04. Ficha técnica SAFE**

Esta mezcla posee un valor calórico de 2,9 kcal/g.

La dieta de cafetería se preparaba semanalmente en tandas de 500 gramos, mezclando homogéneamente los siguientes productos: 165 gr de leche condensada *La Lechera*, 165 gr de pienso estándar *A04* pulverizado, 75 gr de leche en polvo entera *La Asturiana*, 45 gr de azúcar *La Azucarera*, 50 gr de magdalenas *La Bella Easo*. Tras obtener la mezcla, se amasaban porciones en forma de “pellets” similares a los del pienso estándar. La composición porcentual de esta dieta es la siguiente:

Proteínas	15 g
Glúcidos	70 g
Lípidos	13 g
Fibras	2 g

**Mezcla de cafetería**

Esta mezcla posee un valor calórico de 4,6 kcal/g.

### 1.3.- Ratas controles

Las ratas controles procedían de progenitores alimentados con el pienso estándar *ad libitum*. Siempre estuvieron mantenidas bajo esa misma condición nutricional; es decir, dispusieron ampliamente de comida en la jaula. A lo largo del trabajo se han utilizado ratas de diferentes edades, lactantes y adultas. Ello se especificará en cada estudio concreto. Las ratas adultas fueron sacrificadas en dos etapas: 70 días (ratas **C70d**) ó 9 meses de vida (ratas **C9m**).

### 1.4- Ratas subnutridas

El tipo de subnutrición aplicado ocasionó en las ratas una deficiencia nutricional de carácter mixto: se trata de una subnutrición proteico-energética. Se obtuvo mediante una limitación de la cantidad de pienso accesible a los animales, siguiendo una pauta previamente publicada (Escrivá & col., 1992) que se resume en la Fig. 9.

GESTACIÓN		LACTANCIA				DESTETE Y EDAD ADULTA
días de gestación		días de vida				
1...13	14...22,5	1...7	8...14	15...21	22...25	26...70...270
<i>ad libitum</i>	10 g/día	15 g/día	20 g/día	25g/día	30g/día	35% del valor diario control

↑ INICIO DE LA RESTRICCIÓN     
 ↑ NACIMIENTO     
 ↑ DESTETE

Fig. 9. Modelo de subnutrición

El inicio de la restricción tuvo lugar durante la última fase de la gestación (día 14<sup>o</sup>), se continuó a lo largo de la lactancia y tras el destete. Durante las dos primeras etapas (gestación y lactancia), la limitación se aplicó a la madre; así, la deficiencia nutricional en la rata feto y en la lactante fue indirecta, resultado de la restricción materna. A partir del destete, una vez separadas las crías de la madre, la restricción se aplicó directamente a éstas. La cantidad de pienso suministrado varió a lo largo de todas estas etapas (gestación, lactancia y periodo posterior), concretándose en la siguiente pauta:

A partir del día 14<sup>o</sup> de la gestación, las ratas preñadas recibieron diariamente 10 g de pienso hasta el día del parto. Durante la 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> semana de la lactancia se proporcionó a las madres, 15, 20 y 25 g diarios de ese alimento, respectivamente; durante los cuatro días siguientes (los inmediatamente previos al destete) se les suministró 30 g por día. A partir del día 25<sup>o</sup> y hasta la edad adulta, se fijó una pauta de subnutrición mediante la cual las ratas dispusieron del 30-40 % de la comida ingerida *ad libitum* por las controles; para establecer dicha pauta, se calculó el peso del pienso ingerido cotidianamente por éstas, obteniendo el valor promedio de cinco días consecutivos; es decir, la media diaria ingerida entre los días 25<sup>o</sup> y 29<sup>o</sup>; 30<sup>o</sup> y 34<sup>o</sup>; etc., hasta los 70 días. A las ratas destinadas a llegar a los 9 meses de vida se les suministró una cantidad diaria de pienso equivalente al 30-40 % de la ingesta promediada efectuada por las controles de las mismas edades. Las ratas subnutridas fueron, finalmente,

sacrificadas en las mismas etapas que las señaladas en la sección anterior: lactancia o etapa adulta, y en este último caso, a los 70 días (ratas **S70d**) ó a los 9 meses (ratas **S9m**).

**1.5.- Ratas realimentadas con la dieta de cafetería**

A partir de las ratas de 70 días de vida, tanto controles (**C70d**) como subnutridas (**S70d**), se establecieron dos nuevos grupos de animales, mediante una modificación de su pauta de nutrición. Concretamente, el pienso que ingerían (*ad libitum* o con carácter restringido) fue sustituido por la dieta de cafetería, siempre suministrada *ad libitum*. Para efectuar el cambio de nutrición las ratas se eligieron al azar. Los animales transferidos a esa dieta se estudiaron a los 9 meses de vida. Se han designado como:

**C9mCaf:** ratas controles transferidas a la dieta de cafetería.

**S9mCaf:** ratas previamente subnutridas y después transferidas a la dieta de cafetería.

En la Fig. 10 se resume este tipo de pauta de realimentación.

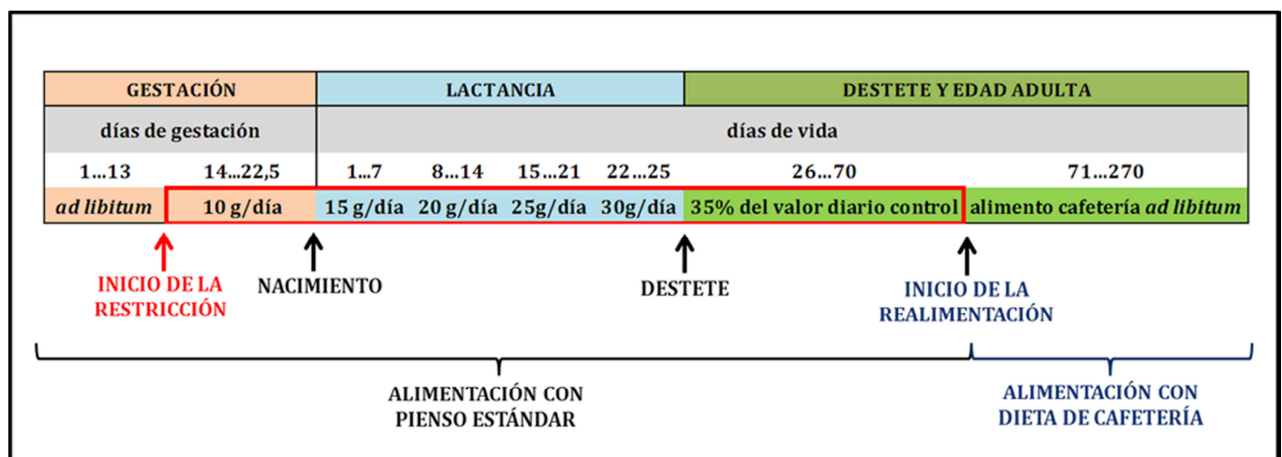


Fig. 10. Modelo de realimentación

**2.- Tratamientos hormonales**

Se han aplicado diferentes procedimientos para los tratamientos con insulina, leptina y glucagón, en función de la edad de las ratas y del tipo de información que se quería obtener sobre la acción de cada hormona. Se utilizó insulina humana biosintética Actrapid (Novo Nordisk A/S, Copenhagen, Dinamarca), leptina recombinante liofilizada de rata suministrada por el profesor A.F. Parlow desde National Hormone & Peptide Program, Harbor-UCLA Medical Center (Torrance, California, EE.UU) y glucagón biosintético liofilizado para humano GlucaGen Hypokit (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca). Para estudiar los efectos a corto y medio plazo, las hormonas se

administraron por vía intracerebroventricular, intravenosa o intraperitoneal, en unas condiciones y dosis que se indican en las secciones correspondientes.

Por su especial complejidad, se describen a continuación: 1) la técnica del “clamp”, efectuada para evaluar la sensibilidad a la insulina, 2) las inyecciones intracerebroventriculares de insulina y leptina, efectuadas para determinar el efecto central de ambas hormonas y 3) las inyecciones de glucagón en la vena cava, para evaluar la sensibilidad hepática a esta hormona.

### 2.1.- Clamp hiperinsulinémico-euglucémico en ratas adultas

Esta técnica consiste en el mantenimiento de la glucemia a un nivel constante a lo largo de una condición hiperinsulinémica. Para lograr esta situación se requiere efectuar una doble infusión por vía intravenosa: insulina, para alcanzar una determinada concentración plasmática, y glucosa, para compensar el efecto hipoglucemiante de la hormona (DeFronzo & col., 1981). Las ratas adultas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso corporal, en el caso de las ratas controles y 40 mg/kg, en el de las subnutridas) y se les practicó una traqueotomía, para prevenir posibles problemas respiratorios. Las muestras de sangre se recogían de la cola. Se administró una dosis de 5,0 UI/h/Kg de insulina a través de una vena safena, mediante una bomba de infusión.

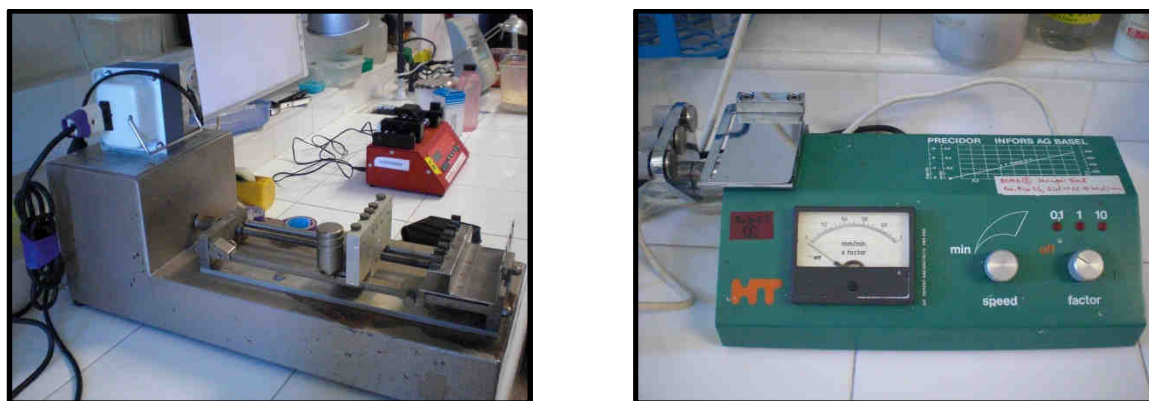


Fig. 11. Bombas de infusión de insulina y glucosa

Se utilizaron tres bombas: Harvard Apparatus 600-900 (Dover, Massachusetts, EE.UU), Precidor (Infors AG, Bottmingen, Suiza) y SyringePump.com (Farmingdale, Nueva York, EE.UU) (Fig. 11). Se calibraron previamente, de modo que a partir de la velocidad de infusión se podía calcular el volumen de solución que se administraba. La solución de insulina contenía heparina, NaCl 0,9% y albúmina sérica bovina 0,028%. Las soluciones de glucosa, al 30% y 40% para controles y subnutridas, respectivamente,

fueron administradas a través de la otra vena safena a partir de los 5 minutos del comienzo de la infusión de insulina. Desde el inicio del ensayo fueron obteniéndose pequeñas muestras de sangre de la cola (a intervalos de unos 5 minutos) para determinar en ellas la concentración de glucosa (como se indicará en la sección 3.2 de Materiales y Métodos). En función del dato obtenido, se fue variando la tasa de infusión de glucosa, de modo que a lo largo del experimento la glucemia permaneciera constante. Esta condición se mantuvo durante 60 minutos; entonces la rata fue sacrificada. La tasa de infusión de glucosa durante ese periodo de tiempo es un parámetro indicativo de la sensibilidad global a la insulina.

### 2.2.- Inyecciones intracerebroventriculares de insulina y leptina en ratas adultas

Esta técnica se realizó en colaboración con el grupo del profesor Manuel Ros (Departamento de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular, Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón). Las ratas se anestesiaron con pentobarbital, a las dosis indicadas en la sección anterior y se fijaron en un aparato estereotáxico (David Koppf, Tujunga, California, EE.UU).



Fig. 12. Aparato estereotáxico para la inyección intracerebroventricular

Después de hacer una incisión en la piel de la cabeza, se practicó un agujero en el cráneo mediante una broca dental (Coordenadas: -1,6 mm lateral hacia la línea media, 0,8 mm anterior respecto a la bregma y 3,5 mm de profundidad respecto a la superficie del cráneo) (Paxinos & Watson, 1997). A continuación, se inyectó la hormona (insulina o leptina), muy lentamente, en el tercer ventrículo por medio de una jeringa Hamilton

(Fig. 12). La cantidad de insulina infundida fue de 10 mU en 5  $\mu$ L (en solución salina) y la de leptina fue de 5  $\mu$ g en 5  $\mu$ L (en PBS, pH 8,0). A las ratas basales se les administró el mismo volumen del solvente respectivo. A continuación se dejó transcurrir un tiempo de 15 minutos. Después, las ratas se sacrificaron por decapitación y se les extrajo el hipotálamo. Éste se congeló inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se conservó a -80 °C hasta su utilización.

### 2.3.- Inyecciones intravenosas de glucagón en ratas lactantes

Estos experimentos se llevaron a cabo para determinar la respuesta de las ratas lactantes de 10 días de vida a esta hormona.

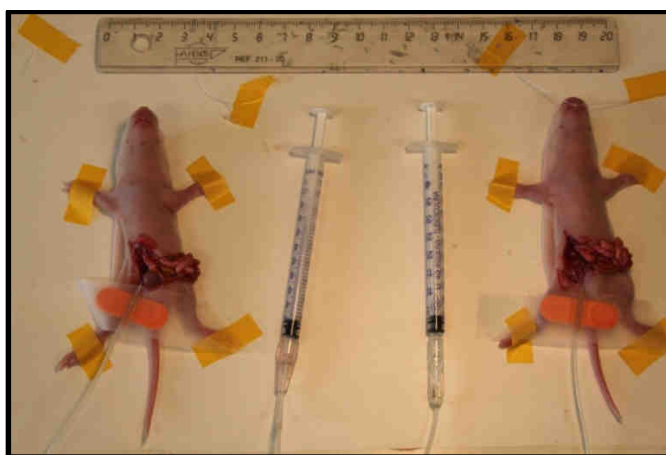


Fig. 13. Experimento de inyecciones intravenosas de glucagón

Para ello, las crías se anestesiaron con pentobarbital a una dosis de 20 mg/kg de peso corporal; una vez perdido el reflejo de retracción de las extremidades posteriores, se abrió la cavidad abdominal y se inyectó el glucagón en el extremo proximal de la vena cava, a la altura del hígado (Fig. 13), a una dosis de 2  $\mu$ g/gramo de peso corporal, disuelto en NaCl 0,9% (40–90  $\mu$ L). Seguidamente, se recogió sangre de la cola a intervalos de 5 minutos durante media hora, determinándose la glucemia con un analizador automático (sección 3.2 de Materiales y Métodos). Durante el curso del experimento, la cavidad abdominal se mantuvo cubierta con una gasa humedecida en suero salino. A los 30 minutos, las crías se sacrificaron y el hígado fue extraído y congelado en N<sub>2</sub> líquido.

### **3.- Análisis de metabolitos y hormonas**

#### **3.1.- Toma de muestras**

Las muestras de sangre y de tejidos de las ratas se recogieron por las mañanas, entre las 10 y las 12 horas. Esto se efectuó siempre en las mismas condiciones, después de ayunarlas durante 16 horas.

#### **3.2.- Análisis de la glucosa en sangre total o suero**

Para el análisis de la glucosa en sangre total, efectuado durante el desarrollo del “clamp” (sección 2.1. de Materiales y Métodos) y en las pruebas de sensibilidad al glucagón (sección 2.3 de Materiales y Métodos), se utilizó el analizador automático OneTouch Ultra 2 (LifeScan, California, EE.UU), basado en la aplicación de unas tiras reactivas que son capaces de succionar por capilaridad un volumen aproximado de 15 µl de sangre. En unos segundos, el aparato efectuaba la lectura de la glucemia por medio de unos electrodos sensibles.

En el caso del suero sanguíneo, éste se obtuvo tras la centrifugación de la sangre a 10000 g durante 15 minutos, separando el sobrenadante (Centrífuga Eppendorf 5415R, Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid). El suero se empleó para analizar la glucosa mediante el Kit de BioSystems (BioSystems, Barcelona) basado en el método de la glucosa oxidasa acoplado a la oxidación de un cromógeno (Trinder, 1969).

#### **3.3.- Análisis de cuerpos cetónicos en sangre desproteinizada**

Para esta determinación se emplearon los desproteinizados de sangre tratada con  $\text{ClO}_4\text{H}$  al 7,5%. Esta mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 10000 g y cada sobrenadante se neutralizó con  $\text{KOH}$  2M. A continuación, una segunda centrifugación permitió separar el pellet (donde quedó el  $\text{ClO}_4\text{K}$ ) del sobrenadante, donde se analizaron los cuerpos cetónicos (Williamson & col., 1962).

- A) Acetoacetato: se evaluó el consumo de NADH espectrofotométricamente tal y como se describe en el caso de la determinación de cuerpos cetónicos en hígado (sección 3.8 de Materiales y Métodos).
- B) 3-hidroxiacetato: en este caso se determinó la aparición de NADH en el espectrofotómetro, de la misma manera en que se detalla en la sección 3.8 de Materiales y Métodos.

La cetonemia se expresó como la suma de ambas concentraciones: acetoacetato + 3-hidroxiacetato.

### 3.4.- Análisis de la insulina en suero sanguíneo

Se analizó por radioinmunoensayo (RIA), utilizando un kit de reactivos suministrado por Millipore (Millipore Corporation, Massachusetts, EE.UU). (Sensibilidad: 0,081 ng/ml). Dicho kit consta de lo siguiente: insulina de rata (como patrón), insulina humana marcada con I<sup>125</sup>, anticuerpos contra insulina porcina procedentes de cobaya y un reactivo precipitante, cuya composición era: Ig G anti-cobaya (guinea pig) procedente de cabra, 3% de polietilenglicol, 0,05% de Tritón X-100 en fosfato salino 0,05M, EDTA 0,025 M y azida sódica al 0,08%.

El protocolo experimental que desarrollamos, siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial, fue el siguiente: se mezclaron las soluciones de insulina patrón o el suero problema con el anticuerpo y la insulina marcada, procediéndose a su incubación durante 20-24 horas a 4 °C. Después, el complejo inmunológico se precipitó durante 20 minutos con el reactivo precipitante. Finalmente, se centrifugó y en el precipitado se midió la radioactividad ligada, con un contador gamma Wallac Wizard 1470 (PerkinElmer, Massachusetts, EE.UU).

### 3.5.- Análisis de glucagón en suero sanguíneo

El glucagón sérico se determinó mediante un RIA de glucagón (Linco Research, EE.UU). (Sensibilidad de 20 pg/ml, coeficientes de variación intra- e inter-ensayo del 10%, reactividad cruzada con oxintomodulina <0,1%,).

El kit correspondiente contenía: tampón de ensayo (Glicina 0,2 M, pH 8,8; EDTA 0,03M, azida sódica 0,08% y BSA 1%), antisuero (anti-glucagón de cobaya), glucagón marcado (I<sup>125</sup>-Glucagón), tampón de hidratación, reactivos de precipitación (Suero IgG de cabra anti-cobaya, polietilenglicol 3% y Triton X-100 0,05% en tampón fosfato salino 0,05M, EDTA 0,025M), glucagón patrón y controles de calidad.

La determinación tuvo lugar siguiendo las instrucciones del proveedor suministradas en el kit de RIA. En resumen, consistió en lo siguiente:

- Día 1: pipetear los tampones de ensayo, preparar la curva estándar y los controles de calidad y las muestras problema. Vortexar, cubrir los tubos y dejar incubar con el anticuerpo del glucagón durante toda la noche a 4 °C.
- Día 2: tratar el I<sup>125</sup>-Glucagón con el tampón de hidratación. Mezclar suavemente y añadirlo a todos los tubos. Vortexar, cubrirlos e incubar toda la noche (22-24 h) a 4 °C.
- Día 3: añadir el reactivo precipitante, vortexar e incubar 20 minutos a 4 °C. Centrifugar durante 20 minutos a 2000 g (4 °C). Decantar los sobrenadantes y dejar secar durante 60 segundos. Finalmente, medir la radiactividad del pellet en el contador gamma antes indicado.

### 3.6.- Análisis de leptina en suero sanguíneo

La leptina se determinó mediante un ensayo de inmunoenzimología de sándwich (ELISA). El kit fue adquirido de Millipore (Millipore Corporation, Massachusetts, EE.UU) y contiene todos los reactivos necesarios para el análisis. (Límite de sensibilidad del ensayo: 0.08 ng/mL para muestras de 10 µL). Este ensayo se basa en la inmovilización de la leptina de la muestra sobre los pocillos de una placa de ELISA recubierta de anticuerpos. Siguiendo las instrucciones de la casa comercial, se realizó un primer lavado de los pocillos y se añadieron las muestras y el antisuero de leptina para rata. Tras incubar a temperatura ambiente y con agitación durante 2 horas, se lavaron de nuevo los pocillos y se agregó un anticuerpo biotinilado de leptina anti-rata. En la segunda incubación con agitación durante una hora, estos anticuerpos se unieron con la hormona inmovilizada en los pocillos. Posteriormente y tras nuevos lavados, se añadió un conjugado de peroxidasa para acoplarlo al complejo anterior. Esta vez, el tiempo de incubación fue de 30 minutos. Después, se realizaron varios lavados. Finalmente, se añadió el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. La placa se incubó 12 minutos, y durante ese tiempo se formó el producto coloreado resultante de la reacción enzimática de la peroxidasa sobre el sustrato. Seguidamente, tras desechar por decantación el contenido de los pocillos, se añadió una solución para detener la reacción. La cantidad de producto coloreado se cuantificó espectrofotométricamente en un lector de placas Infinite M200 (Tecan, Grödig, Austria), determinándose la diferencia de absorbancias a 450 nm y 590 nm. El aumento de absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de

leptina de la muestra. Esto se calcula mediante interpolación en una curva de referencia preparada con leptina patrón.

### 3.7.- Determinación de glucógeno hepático y cortical

Se partió de una cantidad de 50-100 miligramos de corteza cerebral o de hígado que se disolvieron en KOH al 30% y se mantuvieron en el termoblock a 100 °C durante 1 hora. Tras enfriar en hielo, se añadió Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2%, etanol absoluto a -20 °C y se incubaron toda la noche a esa temperatura. Se centrifugó a 10000 g (4 °C) durante 5 minutos y el pellet resultante se redisolvió en agua. Se añadió etanol absoluto e incubó durante 30 minutos a -20 °C. Este proceso de lavado se repitió al menos dos veces. Finalmente el pellet obtenido, que contenía el glucógeno purificado, fue tratado con tampón acetato sódico 100mM (pH 4,8) y amiloglucosidasa (10mg/mL). Tras su incubación en el termoblock a 40 °C durante 60 minutos, se centrifugó en frío 5 minutos a 10000 g. El sobrenadante fue neutralizado con KOH 0,9M y centrifugado de nuevo en las mismas condiciones. En el caso del hígado, la glucosa se determinó colorimétricamente en el sobrenadante neutro, mediante el kit de Biosystems, (sección 3.2 de Materiales y Métodos). Finalmente, el contenido de glucógeno hepático se expresó como mg/g de tejido (Belke & col., 2001).

Para determinar el glucógeno en la corteza cerebral, la glucosa del sobrenadante neutro fue cuantificada espectrofotométricamente por la desaparición de NADPH. La muestra de reacción contenía trietanolamina (TEA) 285mM, MgSO<sub>4</sub> 4mM, ATP 1mM, NADP 0,9mM y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (5 µL/mL). La absorbancia a 340 nm se midió al inicio y 30 minutos después de la adición de 5 µL de hexokinasa. La diferencia de absorbancias es directamente proporcional a la glucosa. El contenido de glucógeno se expresó como µmol/g de tejido, teniendo en cuenta que 1 mol de glucógeno contiene 162 gramos de unidades glucosilo.

### 3.8.- Determinación de lactato, piruvato, cuerpos cetónicos y glucosa hepáticos

Unos 50 mg de muestras de hígado congeladas se trataron con ácido perclórico (ClO<sub>4</sub>H) frío al 6%. Tras la homogeneización con el Ultra-Turrax IKA T10 Basic (IKA-WERKE, Staufen, Alemania), fueron centrifugadas 10 minutos a 10000 g. Los sobrenadantes se neutralizaron con KOH 0,6M y fueron sometidos a una nueva

centrifugación en las mismas condiciones. Los diferentes metabolitos se cuantificaron en estos nuevos sobrenadantes (Williamson & col., 1962).

a) 3-hidroxiacetato y lactato:

Se determinaron según un ensayo espectrofotométrico basado en la aparición de NADH. Las reacciones de oxidación que se producen, en cada caso, son: 3-hidroxiacetato hacia acetoacetato y lactato hacia piruvato. La mezcla de reacción contenía: Tris 0,1M, pH 8,5; NAD 10 mM y una mezcla de hidracina-hidrato con HCl (5% de HH, 35% de HCl 1N y 70% H<sub>2</sub>O destilada). A tiempo cero, se midió la absorbancia a 340 nm. Tras añadir 5 µL de enzima (3-hidroxiacetato deshidrogenasa o lactato deshidrogenasa, en cada caso) (ambas de Roche, Penzberg, Alemania), y esperar 60 minutos, se valoró de nuevo la absorbancia. La diferencia entre ambas es directamente proporcional a la concentración del metabolito. Éste se expresó como µmoles/g de hígado.

b) Acetoacetato y piruvato:

En estos casos, el ensayo espectrofotométrico se basó en el consumo de NADH. Las reacciones discurren en sentido contrario al que se ha descrito antes. La mezcla de reacción contenía: tampón fosfato 0,1M, pH 7 y NADH 5 mM. A tiempo cero, se midió la absorbancia a 340 nm. Tras añadir 5 µL de enzima 3-hidroxiacetato deshidrogenasa o lactato deshidrogenasa para la determinación del acetoacetato o el piruvato, respectivamente y esperar 30 minutos, se midió la segunda absorbancia. La diferencia entre ambas es directamente proporcional a la concentración del metabolito, que se expresó como µmoles/g de tejido.

c) Glucosa:

Se analizó en el sobrenadante neutro, mediante el kit de BioSystems, como se describe en la sección 3.2 de Materiales y Métodos. El resultado se expresó como mg de glucosa/g de hígado.

### **3.9.- Determinación de triglicéridos y colesterol**

Estos lípidos se determinaron en suero sanguíneo, hígado, músculo esquelético y músculo cardíaco. En el caso de los tejidos se separaron previamente los lípidos como se

describe en la siguiente sección. Los triglicéridos y el colesterol se analizaron utilizando unos kits de BioSystems (BioSystems, Barcelona). Las técnicas se basan en la formación de un producto coloreado (Allain & col., 1974; Bucolo & David, 1973) que se cuantifica en un espectrofotómetro (Hitachi U-2000, Pacisa, Madrid).

### 3.10.- Extracción de lípidos tisulares

Se realizaron extracciones de los lípidos contenidos en el hígado, músculo esquelético y músculo cardíaco de ratas adultas. Para ello, se siguió el método descrito por Spaniol & col. (2003) a su vez basado en la técnica de extracción de Bligh & Dyer (1959). Se emplearon 100-120 mg de tejido que se homogeneizaron en 500  $\mu\text{L}$  de tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4) con el Ultra-Turrax. Tras separar una alícuota del homogeneizado para una posterior determinación de las proteínas, se añadió 1 mL de mezcla cloroformo/metanol 1:1 (v/v), se vortexó y se mantuvo durante 60 minutos en agitación orbital a 4 °C. Después, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo, 160  $\mu\text{L}$  de KCl 0,74% y se agitó por inversión. Tras centrifugar las muestras durante 5 minutos a 500 g, se recogieron las fases inferiores orgánicas, a las que se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de una mezcla KCl/Metanol/Cloroformo 94:96:6 (v/v/v). De nuevo, se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos y se recogieron las fases inferiores orgánicas. A continuación, estas fases se evaporaron en corriente de aire seco dentro de una campana. Finalmente, se resuspendieron con 250  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Los triglicéridos y el colesterol total se analizaron colorimétricamente, como se ha descrito en la sección anterior.

### 3.11.- Determinación de ácido úrico hepático

Éste se analizó en la misma alícuota del homogeneizado de hígado que se separó para la determinación de proteínas (sección anterior) en el sobrenadante resultante de una centrifugación de 30 minutos a 10000 g. El kit empleado para el análisis colorimétrico de ácido úrico fue de BioSystems. Se basa en la formación de un complejo coloreado tras la actuación de uricasa y peroxidasa. Se procedió siguiendo las instrucciones del proveedor. El resultado se expresó como  $\mu\text{g}$  de ácido úrico/mg de proteínas.

### **3.12.- Valoración de proteínas**

Las proteínas se determinaron por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como patrón  $\gamma$ -globulina bovina. Esta técnica colorimétrica se basa en el cambio de absorbancia (de 465 nm a 595 nm) producido cuando el colorante azul brillante Coomassie en solución ácida se une a proteínas, a través de sus restos básicos y aromáticos. El reactivo se adquirió de Bio-Rad (Madrid).

## **4.- Análisis de las actividades enzimáticas**

### **4.1.- Enzimas de las vías de síntesis y utilización de cuerpos cetónicos**

Las preparaciones de mitocondrias hepáticas y corticales (secciones 5.1 y 5.2 de Materiales y Métodos) fueron empleadas para el análisis de algunas de las enzimas implicadas en la síntesis y utilización de cuerpos cetónicos. En el caso de la corteza cerebral, se determinaron: 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa, 3-oxoacil-CoA transferasa y acetoacil CoA tiolasa. En el caso del hígado, sólo se determinaron la 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa y la acetoacil CoA tiolasa (este órgano carece de la transferasa).

Estas actividades enzimáticas se determinaron espectrofotométricamente en los dos tejidos, mediante los siguientes procedimientos:

- a) 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa: se midió a 340 nm, la formación de NADH en la reacción de oxidación del 3-hidroxiacetil-CoA hacia acetoacetato. La mezcla de reacción contenía tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,1; cianuro potásico (KCN) 1 mM, NAD 2 mM y 3-hidroxiacetil-CoA 30 mM. Tras registrar la línea basal, un volumen de muestra (5-10  $\mu$ L) fue añadido a la cubeta problema y se evaluó el incremento de absorbancia por minuto. La actividad enzimática se expresó como cantidad de 3-hidroxiacetil-CoA consumido por minuto y por miligramo de proteína (Swiatek & col., 1979).
- b) 3-oxoacil-CoA transferasa: para esta determinación se midió el consumo de acetoacil-CoA en presencia de succinato. La mezcla de reacción contenía: tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,5;  $MgCl_2$  10 mM, iodoacetamida 5 mM y acetoacil-CoA 0,1 mM. Se registró el descenso de absorbancia a 303 nm después de la adición de la muestra (5-10  $\mu$ L) y de succinato (50  $\mu$ moles). La

actividad se expresó como micromoles de acetoacetil-CoA consumidos por minuto y por miligramo de proteína (Williamson & col., 1971).

- c) Acetoacetil-CoA tiolasa: se midió a 303 nm la desaparición de acetoacetil-CoA. La mezcla de reacción contenía: tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,5; MgCl<sub>2</sub> 5 mM, acetoacetil-CoA 0,075 mM y CoA 0,1 mM. Tras registrar la línea basal, se añadió el problema (5-10 µL) y se observó el descenso de absorbancia. La actividad se expresó como cantidad de acetoacetil-CoA consumido por minuto y por miligramo de proteína (Williamson & col., 1971).

#### 4.2.- Actividad de la PI 3-kinasa

La actividad hepática de esta enzima se valoró en estado basal y bajo estímulo insulínico. Las ratas fueron inyectadas por vía intraperitoneal con una dosis de insulina de 5 UI/kg de peso corporal y se sacrificaron 15 minutos después. Para la condición basal, las ratas se trataron con un volumen equivalente de suero salino. Se extrajeron los hígados y se lisaron como se indica en la sección 6 de Materiales y Métodos. Se separó un volumen de lisado equivalente a 1 mg de proteína para inmunoprecipitar con el anticuerpo policlonal anti-IRS-2 (Millipore, Temecula, CA) y los inmunocomplejos se recogieron con proteína agarosa-A (Roche) como se describirá en la sección 7 de Materiales y Métodos. Posteriormente, la actividad de la PI 3-kinasa se determinó evaluando la fosforilación del fosfatidil-inositol, empleando ATP marcado con [<sup>32</sup>P] (Amersham, GE Healthcare, UK), según el procedimiento descrito por Valverde & col., 1999. Sobre los inmunocomplejos ligados a la agarosa se añadieron 25 µL de una mezcla de 1 mg de L-Fosfatidilinositol y L-Fosfatidilserina, disueltos en Hepes 25 mM (pH 7,5) con EDTA 1 mM y sonicados. La reacción se inició añadiendo 100 nM [<sup>32</sup>P] ATP (10 µCi) y 300 µM de ATP, disueltos en un volumen de 25 µL del siguiente tampón: Hepes 25 mM, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM EGTA (pH 7,4). Después de incubar esta mezcla 15 minutos a temperatura ambiente, se detuvo la reacción con 500 µL de una solución cloroformo/metanol (1:2, v/v) en HCl 1% y una mezcla de 125 µL de cloroformo con 125 µL de HCl 10 mM. Tras centrifugar, se recogió la fase inferior (orgánica) y se lavó una vez con 480 µL de metanol/HCl 100 mM, EDTA 2 mM (1 :1, v/v). Se recogió la fase orgánica, se secó bajo corriente de aire y fue resuspendida con cloroformo. Finalmente, las muestras se dispusieron en placas de silicagel (TLC plate Whatman, Clifton, Nueva Jersey, EE.UU). La mezcla de disolventes empleada para desarrollar la

cromatografía fue propanol/ácido acético 2 M (65: 35, v/v). Tras el secado de la cromatoplaca, se visualizó por autorradiografía y se cuantificó densitométricamente.

### 4.3.- Actividad de la $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa

La actividad de esta enzima se midió en las preparaciones de capilares corticales (sección 5.3 de Materiales y Métodos). El kit empleado (Spinreact, Girona) se basa en la transferencia del grupo glutamilo desde el sustrato hasta glicilglicina formando glutamilglicilglicina y 5-amino-2-nitrobenzoato. La velocidad de formación de este último compuesto es proporcional a la actividad de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa presente en la muestra y se puede medir cinéticamente a 410 nm. Se procedió siguiendo las instrucciones del proveedor. El resultado se expresó como mU de  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa/mg de proteínas.

## 5.- Técnicas de fraccionamiento subcelular

### 5.1.- Obtención de mitocondrias hepáticas

Para realizar este fraccionamiento se siguió el protocolo descrito por Rickwood, 1987. Los hígados (100 mg) se homogeneizaron mecánicamente con un potter de teflón en un tampón sacarosa-Tris que contenía: Tris HCl 10 mM, sacarosa 25 mM, EDTA 0,5 mM y pH 7,4. Se centrifugaron a 600 g durante 10 minutos y con los sobrenadantes obtenidos se repitió una centrifugación a 15000 g durante 10 minutos. El pellet resultante, donde se encontraban las mitocondrias, se resuspendió con el tampón citado. Tras su sonicación, se congeló a -80 °C.

### 5.2.- Obtención de mitocondrias corticales

Este fraccionamiento se basó en la técnica descrita por Adzic & col., 2009. Se partió de muestras de corteza cerebral (100-150 mg) y se homogeneizaron con un tampón que contenía: Tris 20 mM, Glicerol 10%, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 2 mM y una mezcla de antiproteasas (indicada en la sección 6 de Materiales y Métodos). El proceso se realizó manualmente en un potter de teflón. Tras recoger una alícuota del homogeneizado para la determinación de las proteínas, se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se sometió a una segunda centrifugación a 16000 g durante 30 minutos. El pellet se resuspendió en 500  $\mu$ L del tampón de homogeneización y se repitió la centrifugación a 16000g durante 30 minutos.

Por último, se desechó el sobrenadante (donde se encontraban el citosol y los microsomas) y se conservó el pellet, donde estaban contenidas las mitocondrias. Éste se resuspendió en un tampón de lisis que contenía: Tris HCl 50 mM (pH 7,4), Glicerol 5%, EDTA 1 mM, DTT 5 mM, Tritón 0,05% y la mezcla de antiproteasas. Se incubó con agitación orbital a 4 °C durante 90 minutos y, finalmente, se sonicó (Sonicador: Sonics & Materials Inc. Danbury, Connecticut, EE.UU).

### 5.3.- Separación de capilares corticales

Estas preparaciones fueron obtenidas de cortezas cerebrales de ratas de 10 días de vida, siguiendo la técnica descrita por Devaskar & col., 1991. Las cortezas cerebrales (500 mg) se homogeneizaron con la solución de Ringer, que contenía: MgCl<sub>2</sub> 1,2 mM, Hepes 15 mM (pH 7,4), glucosa 5 mM y dextrano 1%. El preparado se filtró a través de mallas de nylon de 80 µm. Al filtrado obtenido, se le añadió un mismo volumen de solución de dextrano 26%. A continuación, se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos y el pellet fue resuspendido en el tampón de Ringer. Esta mezcla se pasó por una columna que contenía perlas de vidrio de 0,42–0,60 mm de diámetro. Tras una serie de lavados, las perlas de vidrio fueron retiradas de la columna y los capilares, que quedaron adheridos a ellas, se liberaron utilizando una solución de sacarosa 0,32 M y agitación suave. Los fragmentos de capilares se recogieron por centrifugación de esta solución a 10000 g durante 10 minutos. El pellet, integrado por los microvasos de la corteza, se resuspendió en tampón Hepes 20 mM a pH 7,4. Seguidamente, se sonicó y se determinó la concentración de proteínas. Estas preparaciones de capilares se conservaron a -80 °C hasta su posterior utilización y su pureza se evaluó determinando la actividad de la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (sección 4.3 de Materiales y Métodos).

### 5.4.- Aislamiento de membranas corticales

El extracto crudo de membranas se obtuvo mediante centrifugación diferencial de los homogeneizados de corteza (150 mg) en el tampón Hepes 25 mM (pH 7,4), EDTA 4 mM, sacarosa 250 mM, fénil-metil-sulfonilfluoruro 8 mM y leupeptina 10 µM. El sobrenadante obtenido tras una centrifugación de 5000 g, fue sometido a una segunda centrifugación de 150000 g durante 2 horas. El pellet resultante se resuspendió en Hepes 20 mM pH 7,4, fue sonicado y se determinó la concentración de proteínas. Después, se conservó a -80 °C.

## 6.- Preparación de lisados tisulares

En el caso de la corteza cerebral y el hígado, se partió de unos 100-150 mg de tejido que se lisaron con el homogeneizador Ultra-Turrax, IKA T10 Basic (IKA-WERKE, Staufen, Germany), a velocidad máxima durante 20-30 segundos, en 1-1,5 ml de un tampón de lisis cuya composición era: Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 mM, NaF 10 mM, EDTA 2 mM, Glicerol 10%, Nonidet P40 1%, pH 7,5. Extemporáneamente, se añadieron las siguientes antiproteasas: PMSF 2 mM, Leupeptina 10 µM, o-Vanadato 2 mM, Benzamidina 2 mM y Aprotinina 10 µg/ml. Los homogeneizados se mantuvieron en agitación orbital a 4 °C durante 30-60 minutos y a continuación se centrifugaron a 100000 g durante 1 hora. Se recogió el sobrenadante y se determinó su concentración de proteínas. Finalmente se alicuotó y almacenó a -80 °C hasta su utilización (Laviola & col., 2001).

En el caso del hipotálamo, se homogeneizó en su totalidad (15-25 mg) en el Ultra-Turrax con un tampón RIPA (Flores & col., 2006) que contenía: Tris 100 mM, NaCl 150 mM, P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>4</sub> 10 mM, deoxicolato 0,5%, SDS 0,1%, NP-40 1%, pH 7,6, y la mezcla de antiproteasas antes indicada. Después de agitar a 4 °C durante 30 minutos, se centrifugó 60 minutos a 10000 g y se recogió el sobrenadante.

## 7.- Inmunoprecipitaciones

Se llevaron a cabo en un volumen de lisado que contenía de 500 a 2000 µg de proteínas, completado a 500 µl con el tampón de lisis; sobre ese volumen se añadió una cantidad de 0,5 a 1 µg del anticuerpo primario y la mezcla se mantuvo en agitación orbital a 4 °C, durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, los inmunocomplejos se recogieron introduciendo 20 µl de una de las siguientes preparaciones de agarosa:

- proteína A-agarosa (Roche), cuando el anticuerpo procedía de conejo.
- IgG-agarosa (Sigma), cuando el anticuerpo era monoclonal.
- “Gamma Bind Plus Sepharose” (una forma recombinante de la proteína G) (Amersham, GE Healthcare, UK) cuando el anticuerpo procedía de cabra.

Se incubó a 4 °C, con agitación orbital, durante 2 horas; los inmunocomplejos ligados a la agarosa se separaron en el pellet resultante de una breve centrifugación. A continuación se procedió a su lavado, aplicando uno de los siguientes procedimientos:

a) cuando se destinaron al análisis de las proteínas mediante Western, se efectuaron tres lavados con el mismo tampón de lisis y uno con PBS; finalmente se eluyó con el tampón de carga descrito en la sección 8.1 de Materiales y Métodos (con DTT) calentando 5 minutos a 95 °C.

b) cuando se destinaron a la valoración de la PI 3-kinasa, se lavaron del siguiente modo: dos veces con PBS y Tritón X-100 al 1%; una vez con Tris 100 mM, EDTA 1 mM y LiCl 0,5 M (pH 7,5); una vez con Tris 25 mM, EDTA 10 mM, NaCl 10 mM (pH 7,5). Finalmente, tras centrifugar y descartar el sobrenadante, los inmunocomplejos ligados a la agarosa se conservaron a -80 °C, hasta el momento de la valoración enzimática.

## **8.- Análisis de proteínas específicas: procedimiento del “Western Blotting”**

### **8.1.- Preparación de las muestras**

Un volumen de muestra que contenía entre 15-150 µg de proteínas se mezcló en proporción 1:1 con el tampón de Laemmli (Laemmli, 1970): Tris 72 mM, pH 7,6; glicerol 10% (v/v), SDS 1% (p/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v) y DTT o β-mercaptoetanol 2 mM; se calentó a 95 °C durante 5 minutos, antes de cargarlo en el gel. Para el análisis de los GLUTs y del OBRb, las muestras se trataron con el tampón sin el reductor y no se calentaron.

### **8.2.- Electroforesis y transferencia a membrana**

Se prepararon geles discontinuos con dos zonas de diferente concentración de poliacrilamida: 5% para el gel concentrador y 7-12% para el gel separador. El primero, que contiene los pocillos de depósito, sirve para alinear las muestras; el segundo, para separar las proteínas. La concentración de poliacrilamida utilizada en el gel separador varió en función del peso molecular de la proteína a analizar.

El tampón utilizado en el desarrollo de la electroforesis fue el siguiente: Tris 0,25M, glicina 1,9M y SDS 1%. La electrotransferencia se llevó a cabo en una membrana de PVDF Immobilon-P (Millipore Corporation, Massachusetts, EE.UU) a 100 V, durante 2 horas, en frío, con el siguiente tampón: Tris 0,025M pH 8,3; glicina 0,19M, metanol al 1, 10 ó 20% (porcentaje que varió en relación inversa con el peso molecular de la proteína analizada).

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Dilución
ACC fosforilada (Ser 79)	Cell Signaling	3661	1/1000
Akt	Cell Signaling	9272	1/1000
Akt-fosforilada (Ser 473)	Cell Signaling	9271	1/1000
AMPK $\alpha$	Cell Signaling	2532	1/1000
AMPK $\alpha$ fosforilada (Thr 172)	Cell Signaling	2535	1/1000
$\beta$ actina	Sigma-Aldrich	A5316	1/4000
Bad	Santa Cruz	sc943	1/500
Bad fosforilada (Ser 112)	Cell Signaling	9291	1/1000
Bax	Santa Cruz	sc526	1/500
BelxL	Santa Cruz	sc8392	1/500
Caspasa 3	Cell Signaling	9661	1/1000
Caspasa 3 activa	Chemicon	AB3623	1/1000
ERK	Cell Signaling	9102	1/1000
ERK fosforilada(Thr 202/Tyr 204)	Cell Signaling	9101	1/1000
GLUT 1	Chemicon	AB1341	1/3000
GLUT 2	Millipore	07-1402	1/1000
GLUT 3	Chemicon	AB1344	1/1000
GR (receptor glucagón)	Santa Cruz	sc66912	1/500
GS (glucógeno sintasa)	Cell Signaling	3893	1/1000
GSK3 $\alpha/\beta$	Santa Cruz	sc7291	1/500
GSK3 $\alpha/\beta$ fosforilada (Ser21/9)	Cell Signaling	9331	1/1000
IR $\beta$ <sup>(inmunoprecipitación)</sup>	Santa Cruz	sc711	-
IR $\beta$	Upstate	06-492	1/500
IRS1	Millipore	06-248	1/1000
IRS1 <sup>(inmunoprecipitación)</sup>	Santa Cruz	sc559	-
IRS2	Millipore	06-506	1/1000
IRS2 <sup>(inmunoprecipitación)</sup>	Santa Cruz	sc8299	-
JAK2	Millipore	07-1486	1/1000
JAK2 fosforilada (Tyr1007/1008)	Millipore	07-606	1/1000
JNK	Cell Signaling	9252	1/1000
JNK fosforilada (Thr 183/Tyr 185)	Santa Cruz	sc12882	1/500
MCT1	Millipore	AB3540P	1/1000
MCT2	Santa Cruz	sc50323	1/500
MCT4	Millipore	AB3314P	1/1000
mTOR	Cell Signaling	2972	1/1000
mTOR fosforilada (Ser2448)	Cell Signaling	2971	1/1000
ObR	Santa Cruz	sc1834	1/500
ObR fosforilada (Tyr 1138)	Santa Cruz	sc16421	1/500
p38	Santa Cruz	sc535	1/500
p38 fosforilada (Thr 180/ Tyr 182)	Cell Signaling	9216	1/1000
P70S6K	Cell Signaling	9202	1/1000
P70S6K fosforilada (Thr 389)	Cell Signaling	9204	1/1000
PI3K subunidad p85 $\alpha$	Abcam	AB250	1/1000
PI3K subunidad p85 $\beta$	Abcam	AB252	1/1000
POMC	Abnova	PAB8938	1/1000
PTP1B	Millipore	07-088	1/1000
PYGB/L/M (glucógeno fosforilasa)	Santa Cruz	sc46347	1/500
SOCS3	Cell Signaling	2932	1/1000
Serina fosforilada	Millipore	AB1603	1/1000
STAT3	Cell Signaling	9132	1/1000
STAT3 fosforilada (Tyr 705)	Cell Signaling	9131	1/1000
Tyr fosforilada	Millipore	05-321	1/1000
Tyr fosforilada <sup>(inmunoprecipitación)</sup>	Santa Cruz	sc508	-

**Tabla 1. Anticuerpos Western**

### 8.3.- Inmunodetección

Finalizada la transferencia, se bloquearon todos los sitios de unión inespecíficos a proteínas. Para ello, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación, en la siguiente solución de bloqueo: tampón PBS (NaCl 0,68M, KCl 13,4 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  7,3 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  40 mM) suplementado con leche en polvo desnatada al 5%. En algunos casos, el bloqueo se realizó con una solución de BSA al 3% en PBS. Posteriormente se eliminó este tampón y se substituyó por una solución del anticuerpo primario disuelto en PBS, PBS-BSA 3% o PBS-leche en polvo desnatada 3%. Se incubó a 4 °C durante toda la noche. Algunos anticuerpos fueron conservados a 4 °C con azida sódica al 0,02%, para posteriores reutilizaciones. Todos los anticuerpos que se han empleado, las diluciones aplicadas y la casa comercial de procedencia, están indicados en la Tabla 1.

Tras esta incubación, se realizaron 4 lavados de 10 minutos con agitación en la solución lavadora T-TBS (Tris 0,01M, NaCl 0,15M, Tween-20 al 0,05% (pH 8,0)). A continuación, las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo, dirigido contra las inmunoglobulinas de ratón, cabra o conejo y conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich, San Luís, EE.UU). La incubación se efectuó durante 1 hora, tras la cual se realizó otra serie de lavados con la misma solución anterior.

La detección de los inmunocomplejos se efectuó por quimioluminiscencia, tratando la membrana con los reactivos de revelado “ECL Western Blotting Detection Reagents” y colocándola en una cassette. Posteriormente, fue expuesta a una película radiográfica durante periodos de tiempo que variaron desde unos pocos segundos hasta algunos minutos. Todos los productos necesarios (reactivos, cassettes y películas) se adquirieron de Amersham (Amersham, GE Healthcare, Reino Unido). Tras la exposición, la película se reveló en el procesador Curix 60 AGFA (AGFA-Gevaert, Bonn, Alemania). Por último, se escaneó y se densitometraron las intensidades de las bandas correspondientes a la proteína de interés, aplicando el programa informático ImageGauge 4.0 (ScienceLab 2001, Fujifilm).

### 8.4.- Borrado y reutilización de las membranas

Una vez reveladas las membranas, se sumergieron durante 30 segundos en metanol y 1 minuto en agua; después se almacenaron a -20 °C. Para analizar otras proteínas en estas mismas membranas, se sometieron a un proceso de borrado

("stripping"). Para ello se preparó una solución que contenía Tris 50 mM pH 6,8; SDS 2% y  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM. Las membranas se trataron con ésta y se dispusieron en un baño con agitación a 60 °C, durante 30 minutos. A continuación, se efectuaron seis lavados de 10 minutos cada uno con la solución lavadora T-TBS (especificada en la sección anterior) hasta que desapareció el olor a  $\beta$ -mercaptoetanol. Por último, se procedió a bloquear las membranas y se continuó aplicando la técnica del Western Blot como se ha descrito.

## 9.- Inmunohistoquímica de la corteza cerebral e hipotálamo

Estos estudios tuvieron dos objetivos: a) precisar la localización del glucógeno de la corteza cerebral y b) cuantificar el NPY y POMC en el hipotálamo.

### 9.1- Fijación e inclusión en parafina

Los cerebros de ratas de 1, 10 y 70 días de vida fueron extraídos y se sumergieron en el líquido fijador Bouin (solución acuosa a saturación de ácido pícrico filtrado, formaldehído 33,3% y ácido acético 2%). Se mantuvieron inmersos en esta solución durante al menos 16 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se desechó el líquido fijador y se sumergieron en etanol de 70° durante dos horas, cambiando el alcohol transcurrida la primera hora. A continuación, los cerebros se siguieron deshidratando pasándolos por soluciones de etanol de mayor graduación: un baño de 95° durante 30 minutos y 3 baños de 30 minutos en etanol de 100°. Después se impregnaron en el disolvente orgánico D-Limoneno (3 baños de 15 minutos). Luego se bañaron en parafina líquida (Paraffin M.P. 56-58 °C, Panreac) dentro de una estufa a 60 °C, para eliminar los restos del disolvente (2 baños de 2 horas cada uno). Finalmente, los cerebros se incluyeron en moldes con la parafina definitiva (Paraplast plus, Mc Cormick Scientific) y se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 24-48 horas. Una vez desmoldados se conservaron a 4 °C hasta su utilización.

### 9.2.-Montaje de los cortes en los portaobjetos

Los cerebros incluidos en la parafina se dispusieron en un microtomo (Leica RM 2125RT) para realizar cortes coronales de 5 a 10  $\mu$ m. Los cortes que se estudiaron fueron los correspondientes a la zona de la corteza cerebral y a la zona central, donde se encuentra el hipotálamo (concretamente, a la altura del tercer ventrículo). Todos ellos se

bañaron con agua destilada a 37 °C (baño J.P. Selecta) y cuando el tejido estuvo completamente estirado, se montaron en portaobjetos (Superfrost Plus, Menzel Gläser, Thermo Scientific). Tras una incubación de 24 horas en la estufa a 35-37 °C, los cortes se desparafinaron por contacto, durante unos segundos, con una placa caliente a 72 °C (Bio-optica, Milano S.P.A., Italia). A continuación, se rehidrataron mediante baños de 2 minutos en cubetas que contenían: D-Limoneno, etanol en orden de graduación decreciente (100°, 95° y 70°) y agua destilada.

### 9.3.- Marcaje con anticuerpos

Tras la desparafinación, los portaobjetos se lavaron durante 2 minutos con Tris-NaCl 0,05M. Después, los cortes se aislaron para tratarlos individualmente en un mismo portaobjetos con los diferentes anticuerpos, utilizando un rotulador Dako pen (Liquid Blocker, Invitrogen). Se siguió el procedimiento de marcaje descrito en “Mouse Immunocruz Staining System”, de Santa Cruz (sc-2050) (Santa Cruz Biotechnology, California, EE.UU) con algunas modificaciones. Este procedimiento consistió en lo siguiente: primeramente se bloqueó la actividad peroxidasa endógena empleando el reactivo correspondiente del kit durante 5 minutos. Después, se realizaron dos lavados de dos minutos con Tris-NaCl 0,05 M y se bloqueó con suero de cabra al 10% durante 30 minutos. A continuación, se retiró el suero de cabra y los cortes se incubaron con el anticuerpo primario durante 16 horas a 4 °C en cámara húmeda. Los anticuerpos, sus referencias y las diluciones empleadas para el marcaje histoquímico, se indican en la Tabla 2.

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Dilución
Neu N	Chemicon	MAB377CloneA	1/1000
NPY	Santa Cruz	sc14727	1/500

**Tabla 2. Anticuerpos empleados en la inmunohistoquímica**

NeuN es una proteína expresada casi exclusivamente en el núcleo y citoplasma de las neuronas; por ello se utiliza para marcar este tipo de células. El péptido NPY se expresa fundamentalmente en el hipotálamo.

Tras la incubación, se realizaron dos lavados de dos minutos con Tris-NaCl 0,05M. Después, se efectuó una incubación durante 1 hora con los anticuerpos secundarios correspondientes (procedentes de cabra o ratón). Tras lavar de nuevo dos veces con Tris-NaCl 0,05M, los cortes se trataron con tetrahidrocloreuro de 3,3'-

diaminobenzidina (DAB) (Vector Laboratories, California, EE.UU) durante 2-4 minutos, hasta obtener una coloración marrón que se visualizó con el microscopio Leica DM 1000 (Leica Microsistemas S.L.U., Barcelona). Para detener la reacción con el DAB, los cortes se sumergieron en cubetas con agua destilada y después se procedió a su deshidratación, lavando los portaobjetos durante 2 minutos con soluciones de etanol de graduación creciente. Finalmente, se bañaron 2 veces durante 2 minutos con D-Limoneno y se añadieron unas gotas de Eukitt (Sigma-Aldrich, San Luís, EE.UU), adhesivo que fija los cubreobjetos sobre los portas. Tras 16 horas en campana, las preparaciones quedaron secas y disponibles para la toma de imágenes en el microscopio.

### 9.4.- Análisis histoquímico del glucógeno

Para marcar el glucógeno de la corteza cerebral se aplicó la técnica del ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS). Con algunas adaptaciones, se siguió el protocolo empleado por Kong & col., 2002. Tras el montaje de los cortes en los portaobjetos (sección 9.2 de Materiales y Métodos), se les añadió ácido periódico al 0,5% (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos. Después de un lavado con agua destilada, se trataron con el reactivo de Schiff (Sigma-Aldrich) durante 25 minutos. Por último, se procedió a la deshidratación y montaje con los cubreobjetos. También se llevaron a cabo controles negativos tratando con  $\alpha$ -amilasa (Sigma-Aldrich) durante 1 hora antes de la aplicación del ácido periódico (amilasa al 0,1% en tampón fosfato 0,2M, pH 6,9). En estas muestras no se encontró glucógeno debido a la digestión desarrollada por esta enzima. De manera similar, se realizó un control con dimedona (5,5-dimetil-1,5-ciclohexanodiona 95%, Sigma-Aldrich) durante 15 minutos, en un baño a 65 °C, antes de la tinción con el reactivo de Schiff (dimedona a saturación: solubilidad 4g/L en agua a 20 °C; se preparó a una concentración de 8 mg/mL y se filtró). En estas muestras no se tiñeron los vasos ni el tejido conectivo que contenían mucopolisacáridos y glicoproteínas.

### 9.5.- Toma de imágenes

Una vez montadas las preparaciones con los cubreobjetos, las imágenes se tomaron en un microscopio Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc, Nueva York, EE.UU) acoplado a una cámara digital y al software de tratamiento de imágenes ArchiMED.

## 10.- Análisis de la expresión génica

### 10.1.- Extracción del ARN hipotalámico

Para analizar la expresión de algunos genes del hipotálamo en ratas de diferentes edades y condiciones (1, 10 y 70 días de vida; controles y subnutridas), se extrajo en primer lugar su ARN. El método seguido fue el del Trizol. Este reactivo lisa las células del tejido manteniendo la integridad del ARN (Chomczynski & Sacchi, 1987). Cada hipotálamo fue triturado en un mortero con nitrógeno líquido e inmediatamente después se trasladó a un eppendorf que contenía 1 mL de Trizol. A continuación, se vortexó vigorosamente durante 30 segundos y se incubó en hielo durante 5 minutos. En la fase de separación, se añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo y después de vortexar, se efectuó una incubación a temperatura ambiente para facilitar la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Después de una centrifugación de 15 min a 15000 g y a 4 °C, la mezcla se separó en tres fases: inferior orgánica (fenol-clorofórmica), interfase y superior acuosa, en donde estaba el ARN. Se recogió esta última fase y se trató con 500  $\mu$ L de isopropanol para precipitar el ARN. Después de agitar por inversión, se incubó a -20 °C durante 16 horas. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 15000 g y 4 °C. Después de aspirar los sobrenadantes, los pellets se lavaron con 1 mL de etanol frío al 75% y tras una centrifugación corta (10 min, 15000 g, 4 °C) se desecharon de nuevo los sobrenadantes. Por último, los pellets de ARN se dejaron secar durante 10-20 minutos en la campana y se resuspendieron con 20  $\mu$ L de agua libre de ARNasas.

Para conocer la concentración del ARN total, se preparó una dilución 1:50 de cada muestra con agua destilada. Se cuantificó la absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro con luz ultravioleta Biomate3 (ThermoSpectronic, Thermo Fisher, Madrid). Teniendo en cuenta que 1 unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 40  $\mu$ g/ $\mu$ L de ARN (Sambrook & col., 1989), se calculó la concentración. Por otro lado, la relación de absorbancias 260/280 indica el grado de pureza del ARN; se considera óptima si está comprendida entre 1,8-2.

### 10.2.- Determinación de la integridad del ARN

Para comprobar si la integridad del ARN se mantuvo durante el proceso de aislamiento, las muestras se sometieron a una electroforesis horizontal en gel de agarosa. Este gel estaba compuesto por: TBE 1x (Tris-borato 90 mM pH 8,3; EDTA 2 mM),

agarosa 1% y bromuro de etidio 0,01%. Una vez solidificado y dispuesto en la cubeta con el tampón TBE 1x, se tomó un volumen de cada muestra correspondiente a 1 µg de ARN y se mezcló con 2 µL de LSB 6x (Tris 0,5 M, pH 6,8; glicerol 47% (v/v), SDS 12% (p/v), azul de bromofenol 0,006%, DTT 9,3%) (Laemmli, 1971) y agua destilada. Esta mezcla se cargó en los pocillos y la electroforesis se desarrolló durante 30 minutos a 90 V. Transcurrido este tiempo, se visualizó en un transiluminador LONGLIFE™ Filter (Spectroline, Nueva York, EE.UU) de luz UV. Con el ARN no degradado, se observaban dos nítidas bandas correspondientes al ARNr 28S y 18S. Se debe obtener una relación 2:1 de ARNr 28S respecto del 18S.

### 10.3.- Transcripción inversa del ARN

El ARN purificado y aislado se transformó en ADN complementario (ADNc) siguiendo las instrucciones del kit: “High capacity cDNA Reverse Transcription kit (2x)” (Applied Biosystems, California, EE.UU). El protocolo se basó en la preparación de una mastermix que contenía tampón (10x), dNTPs (25x), *random primers* o cebadores (10x), la enzima transcriptasa inversa y el inhibidor de ARNasas. En un volumen final de 50 µL, se mezclaron 25 µL de esta mastermix con el ARN de cada muestra y agua libre de ARNasas. Después se incubaron en un termociclador Verity 96 well Thermocycler (Applied Biosystems, California, EE.UU) durante 10 minutos a 25 °C, seguidos de 120 minutos a 37 °C. Finalmente, los ADNc se conservaron a 4 °C hasta su utilización.

Suponiendo que todo el ARN se hubiera transformado, la concentración final de ADNc sería de 80 ng/µL, puesto que se añadió, cada vez, una cantidad equivalente a 4 µg de ARN en un volumen final de 50 µL. Para comprobar que todo el ARN de las muestras se había convertido en ADNc, se realizaba una PCR de GAPDH como control.

### 10.4.- Desarrollo de la RT-qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método muy sensible y fiable que se utiliza para amplificar los transcritos de ADNc obtenidos mediante la transcripción inversa del ARN. Siguiendo el protocolo de “TaqMan® Gene Expression Assays” (Applied Biosystems, California, EE.UU), en primer lugar se consideró el número de reacciones, por duplicado, de cada una de las muestras (incluyendo los controles sin muestra y los controles endógenos). A continuación, se hicieron las preparaciones para cargar la placa de PCR, mezclando cada muestra de ADNc con las proporciones adecuadas de los siguientes reactivos: mastermix “FastStart Universal

Probe Master (Rox)” (Roche, Penzberg, Alemania) y los *primers* adecuados en cada caso (Tabla 3).

Símbolo del gen	Nombre del gen	Especie	Localización en el cromosoma	Referencia de la secuencia del gen	Longitud amplicón	Código Taqman®
<i>Npy</i>	Neuropeptido Y	Rata	Chr.4: 78038013 - 78045187	NM_012614.1	108	Rn01410145_m1
<i>Pomc</i>	Proopiomelanocortina	Rata	Chr.6: 26931969 - 26937789	NM_139326.2	92	Rn00595020_m1
<i>Rps18</i>	Proteína ribosomal 18s	Rata	Chr.20: 5083626 - 5087304	NM_213557.1	62	Rn01428913_gH

**Tabla 3. Primers empleados. Suministrados por Applied Biosystems, California, EE.UU**

También se añadió agua libre de ARNasas para ajustar los volúmenes. Esta mezcla se cargó en placas de 96 pocillos (20 µL en cada uno) y fueron analizadas en la Unidad de Genómica de la Facultad de Biología de la UCM (UCM-Parque Científico de Madrid). En este CAI cuentan con el termociclador (7900HT Fast Real-Time PCR instrument) que ejecuta un programa de 40 ciclos, de 10 minutos cada uno, a 95 °C.

### 10.5.- Cálculo de la expresión génica relativa

En una RT-qPCR los genes se detectan por acumulación de señal fluorescente, expresada numéricamente como Ct (“cycle threshold”) o número de ciclos requeridos para superar un determinado umbral de intensidad (“threshold”). Los niveles de Ct son inversamente proporcionales a la cantidad del gen de interés en la muestra y se analizaron empleando el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Usando este algoritmo, en primer lugar se normalizó la expresión del gen en todas las muestras mediante el control endógeno elegido, el cual se expresaba de manera uniforme y constante en todas ellas:

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{gen de interés})} - Ct_{(\text{gen endógeno: RpS 18})}$$

En segundo lugar, se comparó la expresión del gen en cada muestra problema con las de referencia o controles:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{muestra problema})} - \Delta Ct_{(\text{muestra de referencia})}$$

## 11.- Estudios de imagen de Resonancia Magnética Nuclear

Para llevar a cabo esta técnica se utilizaron 30 ratas hembras divididas en 6 grupos de 5 animales. Los dos primeros correspondían a las que habían estado subnutridas hasta los 70 y 270 días de vida, respectivamente. El tercer grupo estaba

formado por las ratas de 270 días que se habían subnutrido y después realimentado con dieta de cafetería a partir de los 70 días. El cuarto y el quinto grupo estaban constituidos por ratas de 70 y 270 días, respectivamente, alimentadas *ad libitum* con pienso estándar. El último grupo se componía de ratas controles de 270 días que habían sido realimentadas con dieta de cafetería a partir de los 70 días.

Las imágenes de resonancia magnética se tomaron en el CAI de Resonancia Magnética Nuclear de la UCM. Los animales fueron anestesiados con isofluorano y dispuestos en un tomógrafo Bruker BioSpin MRI GmbH (BioSpec: 47/40, Bruker, Ettlingen, Alemania) de 4.7 T e imán de 40 cm (Fig. 14). La secuencia de repetición de “spin” fue de 20 ms y el tiempo de resonancia fue de 15ms. La matriz de las imágenes se correspondía con 256×128 y el campo visual (“field of view” o FOV) se fue modificando en función del tamaño de cada animal. Para estudiar todo el cuerpo de cada rata se tomaron imágenes en capas contiguas y sucesivas longitudinalmente, desde la cabeza hasta la base de la cola (Granton & col., 2010). El número medio de capas obtenidas por animal fue de 24 y el programa utilizado para la toma de estas imágenes fue el software Paravision.



Fig. 14. Bruker Biospec 47/40 para la toma de imágenes de resonancia

### 11.1.- Tratamiento de las imágenes

Para la cuantificación de la grasa total, cada una de las capas fue evaluada individualmente utilizando el programa informático de tratamiento de imágenes Image J Launcher 1.46r. Este programa permitió seleccionar un umbral (“threshold”) (Otsu, 1979) para establecer las regiones correspondientes al tejido adiposo y poder cuantificarlas. En primer lugar se determinaron las áreas. Para ello, los píxeles que se correspondían con regiones grasas, fueron sumados automáticamente por el programa y

multiplicados por el área de cada píxel. En segundo lugar se cuantificaron los volúmenes, multiplicando el área correspondiente al tejido adiposo de cada capa por el grosor de la misma (1.5 mm). Finalmente, el volumen total de tejido adiposo se determinó sumando los volúmenes de todas las capas que componían el animal, según Shen & col., 2003. Este análisis proporcionó una medida directa del volumen total de tejido graso en cada animal. La masa de este tejido se calculó asumiendo que su densidad es de 0,90 g/mL (Siri, 1961), que el grado de hidratación es el mismo en todos los depósitos grasos y que no hay diferencias al respecto entre los grupos de animales (Ishikawa & Koga, 1998).

### **11.2.- Cuantificación de la grasa visceral y subcutánea**

Aunque no fue posible diferenciar los tipos específicos de grasa interna (como por ejemplo: mesentérica, retroperitoneal, etc.) esta técnica permitió identificar la grasa visceral y la subcutánea (Rong-Ying & col., 2009; Thomas & Bell, 2003). El tejido adiposo contenido dentro del abdomen fue considerado como visceral. En cada capa de todos los animales, se utilizaron las herramientas contenidas en el programa Image J para cuantificarlo (Ishikawa & Koga, 1998). De manera similar, se identificó y midió el tejido adiposo subcutáneo (Whittle & col., 1999). La masa de los dos tipos de tejido adiposo se calculó como se ha descrito para la grasa total.

### **11.3.- Medición de parámetros antropométricos**

Para valorar algunos índices como el de Lee o el de masa corporal, en las imágenes de resonancia se determinaron algunos parámetros antropométricos como la longitud naso-anal, el diámetro de la cintura a la altura del ombligo y el diámetro torácico, medido debajo de las patas delanteras. Para realizar estas determinaciones, se escogió la capa central de cada animal y se usaron herramientas del programa de tratamiento de imágenes Image J según Maurovich-Horvat & col., 2007.

## **12.- Expresión de los resultados**

Los valores presentados constituyen la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de los datos obtenidos a partir de un número suficiente de experimentos, que está indicado en los resultados correspondientes. La significación estadística de la diferencia entre las medias fue determinada mediante dos tests: la t de Student o el análisis de la varianza (ANOVA). Éste último se empleó para comparaciones múltiples. Los soportes

informáticos utilizados para estos cálculos estadísticos fueron los programas SPSS y Excel. La significación se expresó del siguiente modo:

\* cuando  $p < 0,05$ ; \*\* cuando  $p < 0,01$ ; \*\*\* cuando  $p < 0,001$ .

En el caso de las comparaciones múltiples, las significaciones se indicaron mediante letras como superíndices; letras distintas expresan una diferencia significativa, con un grado mínimo de  $p < 0,05$ .



## **IV. RESULTADOS**



## IV. RESULTADOS

### 1.- Estudio del hígado de ratas lactantes

#### 1.1.- Características del hígado de las ratas lactantes de 10 días

Los hígados de las ratas subnutridas lactantes pesaron un 55% menos que los de sus controles. Sin embargo, la relación peso hígado/peso cuerpo no se vio alterada. El contenido de glucosa y lactato hepáticos disminuyeron con la subnutrición, mientras que el glucógeno y los cuerpos cetónicos se incrementaron (Tabla 4).

	CONTROLES	SUBNUTRIDAS
Peso hígado (g)	0,621 ± 0,015	0,347 ± 0,005 ***
Peso hígado/ peso cuerpo	2,84 ± 0,07	2,75 ± 0,04
Glucosa (mg/g)	1,13 ± 0,04	0,57 ± 0,03 ***
Glucógeno (mg/g)	20,5 ± 1,3	33,4 ± 1,3 ***
Lactato (μmol/g)	1,23 ± 0,04	0,72 ± 0,07 ***
Piruvato (μmol/g)	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Cuerpos cetónicos (μmol/g)	0,88 ± 0,05	1,58 ± 0,09 ***

Tabla 4. Peso del hígado, relación peso hígado/peso cuerpo y contenido hepático de glucosa, glucógeno, lactato, piruvato y cuerpos cetónicos de las ratas lactantes de 10 días de vida. Los datos están expresados como las medias ± SEM y se corresponden con 6-8 determinaciones para cada condición. Las diferencias significativas se reflejan como: \*\*\*p<0,001.

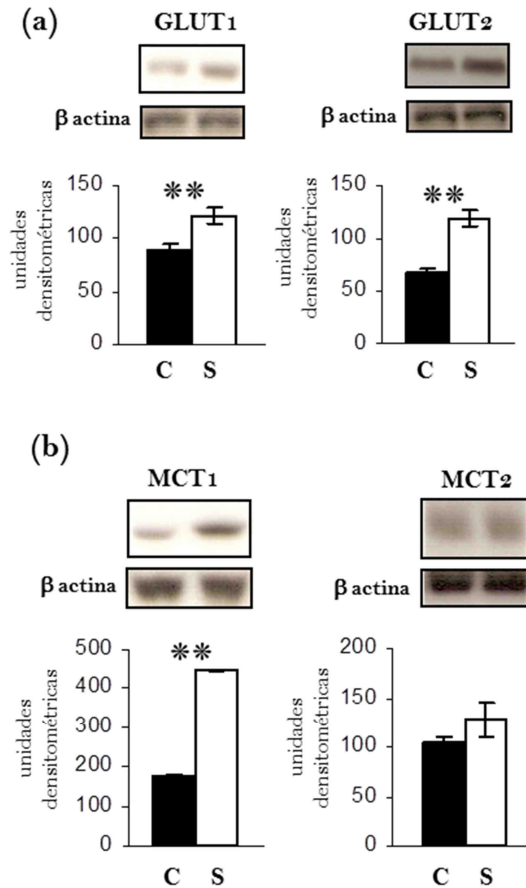
#### 1.2.- Actividades de enzimas mitocondriales del metabolismo cetónico

Se evaluaron las actividades de las enzimas mitocondriales hepáticas implicadas en la producción de cuerpos cetónicos. La actividad de la 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa no se modificó por la subnutrición: 86±5 en controles frente a 89±7 en subnutridas. Por el contrario, la acetoacetyl-CoA tiolasa aumentó en un 43% en la población de ratas subnutridas: 102±5 vs. 69±7. En ambos casos se expresa como nmol/min/mg, p<0,01 (el análisis de estas actividades está detallado en la sección 4.1 de Materiales y Métodos).

### 1.3.- Transportadores de glucosa y monocarboxilatos

A continuación se analizó el efecto de la subnutrición sobre los transportadores de glucosa y de monocarboxilatos. Tanto GLUT1 como GLUT2 se encontraron incrementados (Fig. 15a).

Fig. 15. (a) Transportadores de glucosa (GLUT-1, GLUT-2) y (b) transportadores de monocarboxilatos (MCT1, MCT2) en el hígado de ratas lactantes de 10 días de vida: C, controles; S, subnutridas. Las barras negras se corresponden con las controles y las blancas con las subnutridas. Se trata de las medias  $\pm$  SEM de 6-8 determinaciones independientes. En la parte superior de la figura, se han incluido autorradiografías representativas en cada caso. Las diferencias entre controles y subnutridas fueron:  $**p < 0,01$ .



En cuanto a los transportadores de monocarboxilatos, el MCT1, la forma predominante en el hígado, aumentó sustancialmente en los animales subnutridos; por el contrario, no se observaron cambios en los niveles de MCT2 (Fig. 15b).

### 1.4.- Enzimas reguladoras del metabolismo del glucógeno

Analizamos la expresión de la glucógeno sintasa (GS) y glucógeno fosforilasa (GP), enzimas claves en el metabolismo del glucógeno. GS experimentó un marcado aumento en las ratas subnutridas, quedando aproximadamente 5 veces por encima del valor control, mientras que la GP disminuyó (Fig. 16).

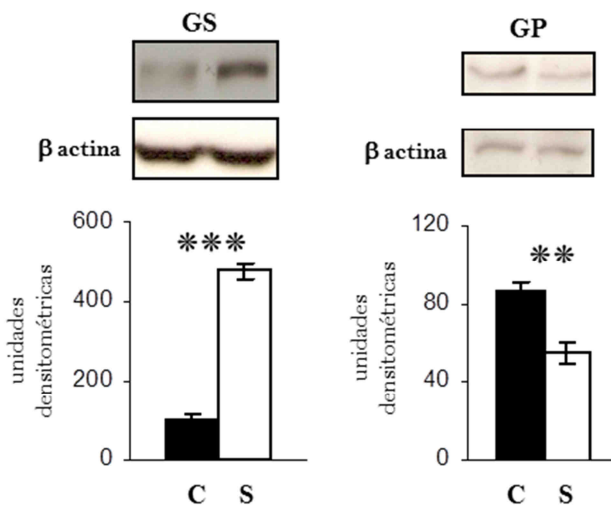


Fig. 16. Glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa (GS, GP) en el hígado de ratas de 10 días de vida: C, controles; S, subnutridas. Las barras negras se corresponden con las controles y las blancas con las subnutridas.

Se han incluido autorradiografías representativas. Los datos son las medias  $\pm$  SEM de 6-8 determinaciones independientes. Las diferencias entre controles y subnutridas fueron: \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

### 1.5.- Vía de señalización de la insulina

Para estudiar el posible efecto de la subnutrición sobre la sensibilidad hepática a la insulina se analizaron algunas proteínas de la vía de señales de esta hormona. No se encontraron diferencias entre ambos grupos de ratas (controles y subnutridas) en las siguientes: receptor, IRS-1, isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de p85 (la subunidad reguladora de la PI3K) (Fig. 17a). Sin embargo, se hallaron incrementos significativos de IRS-2 total, IRS-2 fosforilado e IRS-2 asociado con el receptor (en la condición basal) en las ratas sometidas a subnutrición (Fig. 17b). Igualmente, tanto el contenido de Akt como de Akt fosforilado se encontraron aumentados en esas ratas (Fig. 17c). La actividad de la PI3K asociada con el IRS-2 fue casi inapreciable en el estado basal. Tras la administración de insulina (5 UI/kg por vía i.p.) esta actividad aumentó más en los animales restringidos que en los controles (Fig. 17d).

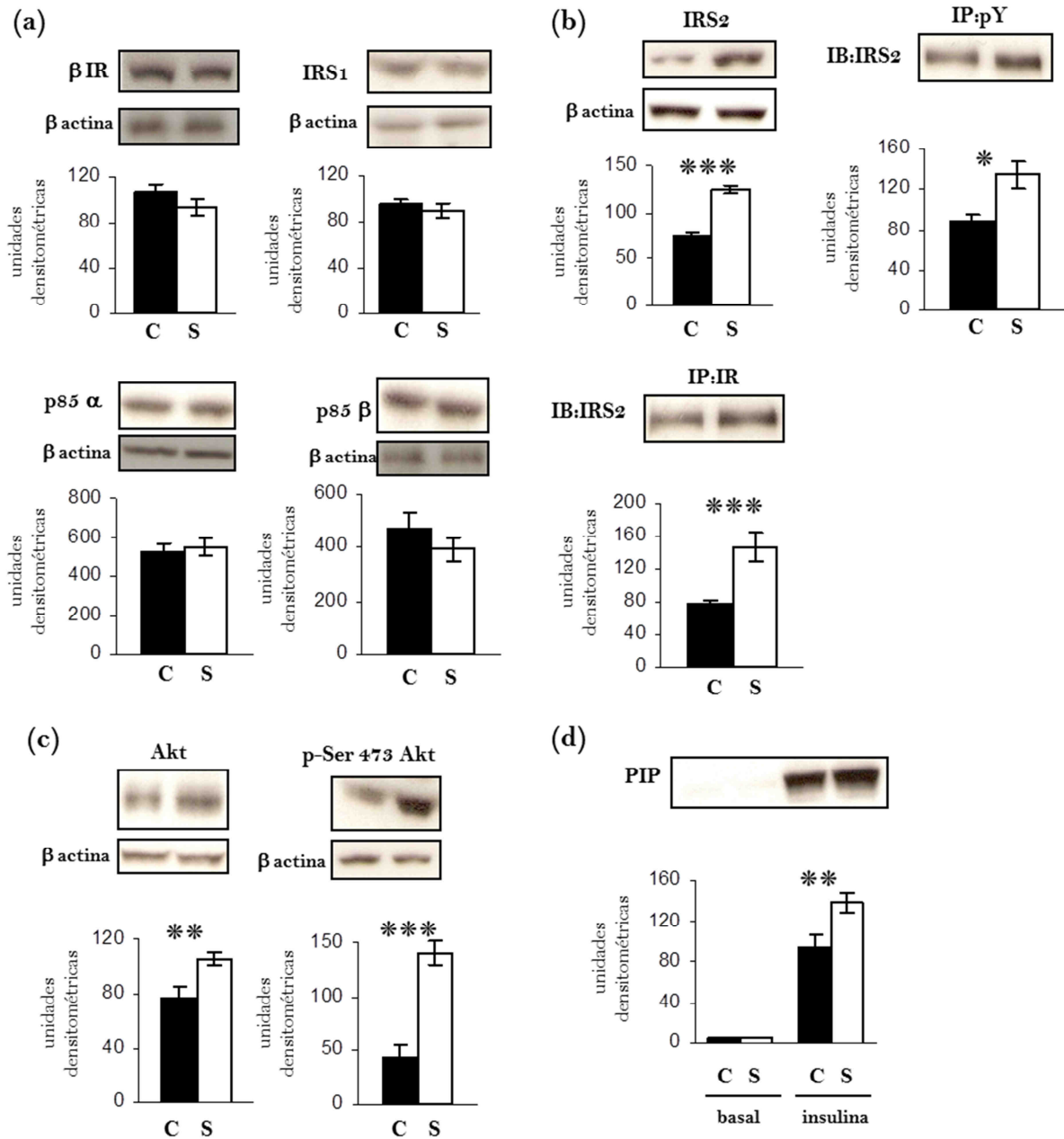


Fig. 17. Diferentes proteínas de la vía insulínica en el hígado de ratas lactantes de 10 días de vida. (a) Receptor de insulina (IR), sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1), subunidades de la fosfatidilinositol kinasa-3: p85 $\alpha$  y p85 $\beta$ . (b) Sustrato del receptor de insulina-2 (IRS-2), IRS-2 fosforilado en tirosina, IRS-2 asociado a IR. (c) Proteín-kinasa B (Akt) y Akt fosforilada en Ser-473. (d) Actividad de PI3kinasa asociada a IRS-2. Se muestran los autorradiogramas más representativos. Las gráficas (barras negras, controles y barras blancas, subnutridas) corresponden a las medias  $\pm$  SEM de 6-8 determinaciones independientes. C, controles; S, subnutridas. Las diferencias entre ambos grupos fueron: \*p<0,05; \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001.

Las isoformas fosforiladas de la GSK3, implicada en la regulación de la síntesis del glucógeno y diana de la Akt, también se estudiaron en el hígado de estas ratas. La p-GSK3 $\beta$  (predominante en el hígado) experimentó un aumento mayor en las ratas

subnutridas tras la estimulación con la insulina indicada anteriormente (Fig. 18a). Por último, se observó que la hormona indujo un incremento de la fosforilación de la proteína P70S6 kinasa en ambas poblaciones de animales; sin embargo, en la condición basal la cantidad de P70S6 kinasa fosforilada era mayor en las ratas restringidas (Fig. 18b).

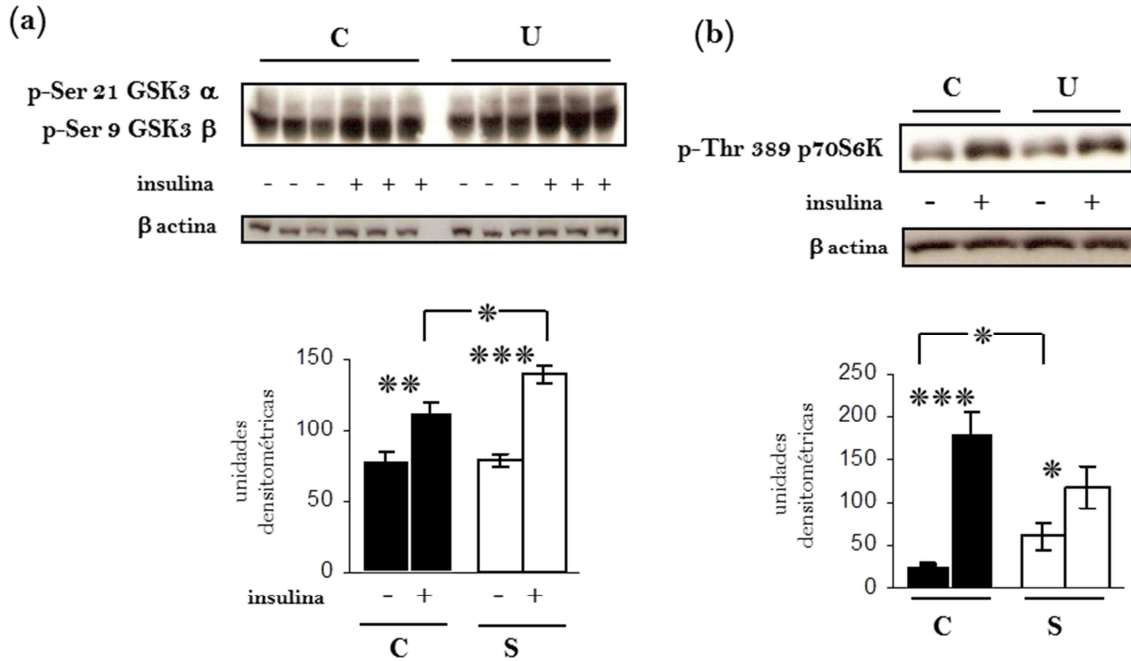


Fig. 18. Contenido de glucógeno sintasa kinasa-3 fosforilada (GSK3) (a) y P70S6 kinasa fosforilada (b) en el hígado de ratas lactantes, tanto en la condición basal como en la tratada con insulina. Las barras (negras, controles y blancas, subnutridas) de los gráficos son las medias  $\pm$  SEM del análisis de 6-8 determinaciones independientes. En la parte superior, se muestran autorradiografías representativas. C, controles; S, subnutridas. Las diferencias entre estos grupos y entre las condiciones basal y tratada con insulina fueron: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ , según se indica en las gráficas.

### 1.6.- Sensibilidad hepática al glucagón

La sensibilidad hepática al glucagón se estudió analizando su receptor así como los efectos de esta hormona sobre el contenido de glucógeno y sobre la glucemia. El receptor del glucagón estaba considerablemente reducido en las ratas subnutridas (Fig. 19a).

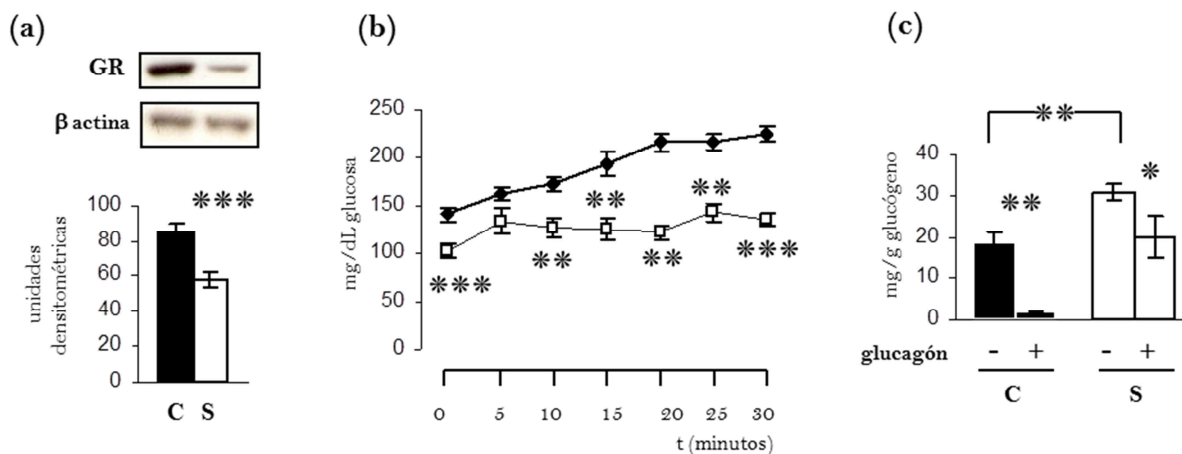


Fig. 19. En ratas lactantes de 10 días de vida, se muestran: (a) Receptor hepático de glucagón (GR), incluyendo un autorradiograma típico. (b) Glucemia basal y su evolución tras la administración de glucagón. (c) Contenidos de glucógeno hepático basal y tras la administración de glucagón. Esta hormona se administró en las condiciones descritas en Materiales y Métodos (sección 2.3). Las barras y símbolos negros corresponden a las ratas controles (C) y los blancos a las subnutridas (S). Los valores mostrados son las medias  $\pm$  SEM de 8 determinaciones independientes. Las diferencias significativas entre C y S, así como entre las condiciones basal y estimulada, se representan como: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

Para evaluar la respuesta al glucagón, se administró una dosis de la hormona, (2  $\mu$ g/g por la vena cava, como se explica en la sección 2.3 de Materiales y Métodos) y se midieron la glucosa sérica y el glucógeno hepático. Como se ve en la Fig. 19b, la glucemia fue incrementándose progresivamente a lo largo de 30 minutos en las ratas controles; sin embargo, en las subnutridas sólo experimentó un ligero aumento durante los primeros cinco minutos y los valores se mantuvieron siempre por debajo de sus respectivos controles (Fig. 19b). En cuanto al contenido de glucógeno, el glucagón causó una reducción muy importante (en torno al 90%) en los animales controles mientras que en los subnutridos, (cuyos niveles basales de glucógeno estaban más altos) la disminución fue bastante menor (del 65%) (Fig. 19c).

## 2.- Estudio de la corteza cerebral de ratas lactantes

### 2.1.- Características generales de las ratas lactantes de 10 días

Las características de los dos grupos de ratas lactantes, controles y subnutridas, están reflejadas en la Tabla 5. En las ratas subnutridas se observaron disminuciones del 54% en el peso corporal y del 18% en el peso del cerebro, respecto de los valores controles. Sin embargo, la relación peso cerebro/peso cuerpo fue mayor en el caso de las ratas restringidas. Los niveles sanguíneos de glucosa, insulina y glucagón se

encontraron disminuidos en los animales subnutridos (en un 15, 65 y 60%, respectivamente) mientras que los cuerpos cetónicos experimentaron un aumento del 45%. La subnutrición también produjo un incremento del 30% del glucógeno presente en la corteza cerebral, en comparación con los animales controles (Tabla 5).

	CONTROLES	SUBNUTRIDAS
Peso corporal (g)	21,9 ± 0,7	12,3 ± 0,2 ***
Peso cerebro (g)	0,74 ± 0,06	0,61 ± 0,05 ***
Peso cerebro/peso corporal	3,33 ± 0,07	4,97 ± 0,11 ***
Glucosa en suero (mg/dL)	144 ± 3	128 ± 3 ***
Insulina en suero (ng/mL)	0,87 ± 0,14	0,29 ± 0,06 ***
Glucagón en suero (pg/ml)	128 ± 12	48 ± 2 ***
Cuerpos cetónicos en suero (μmol/mL)	0,83 ± 0,007	1,20 ± 0,11 **
Proteínas en corteza cerebral (mg/g)	122 ± 3	127 ± 8
Glucógeno en corteza cerebral (μmol/g)	3,5 ± 0,2	4,6 ± 0,2 **

**Tabla 5. Características de las ratas lactantes de 10 días de vida. Los datos están expresados como media ± SEM y se corresponden con 8-12 determinaciones para cada condición. Las diferencias significativas se reflejan como: \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001.**

Para identificar la localización celular del glucógeno acumulado en la corteza cerebral, se efectuaron estudios citoquímicos e inmunohistoquímicos. En primer lugar, se tiñeron las neuronas con un anticuerpo correspondiente a la proteína Neu-N (Mullen & col., 1992), presente exclusivamente en las células neuronales (Figs. 20c y 20d).

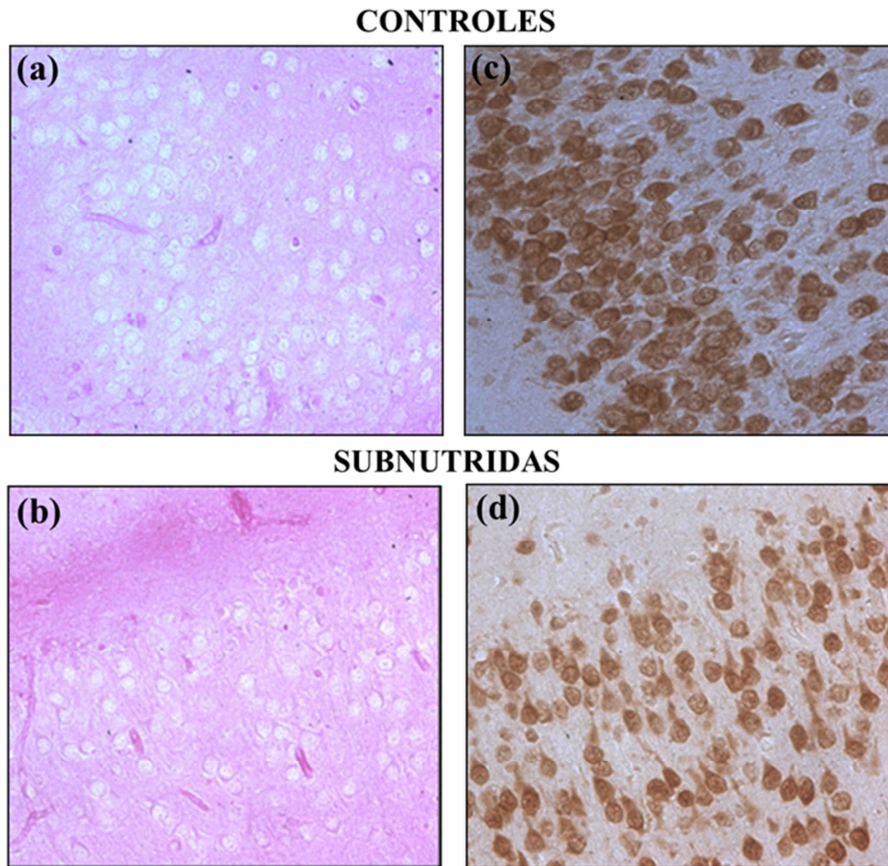


Fig. 20. Microfotografías de cortes de 10  $\mu\text{m}$  de la corteza cerebral de ratas lactantes (10 días de vida). Tinción de glucógeno con reactivo de Schiff (a) y (b). Inmunohistoquímica con anti Neu-N (c) y (d). Aumento del microscopio: 40x.

A continuación, se llevó a cabo la tinción del glucógeno en cortes seriados y se obtuvo una coloración rosada, propia del reactivo de Schiff, que puso de manifiesto este polisacárido, ampliamente distribuido por todo el córtex de los animales (Figs. 20a y 20b). Según se puede apreciar en las fotografías, las células que no se tiñeron se corresponden morfológicamente con las marcadas con Neu-N, demostrando que las células neuronales están desprovistas de glucógeno, tanto en las ratas subnutridas como en las controles.

## 2.2.- Transportadores de glucosa: GLUTs

Para medir los transportadores de glucosa en los capilares de la corteza cerebral, se obtuvieron unas preparaciones enriquecidas en microvasos. En ellas se determinó el grado de pureza respecto del homogeneizado inicial, midiendo la actividad de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa (sección 4.3 de Materiales y Métodos). En el caso de las ratas lactantes controles, las actividades fueron:  $7,8 \pm 2$  mU/mg de proteína en las preparaciones enriquecidas y de  $0,8 \pm 0,08$  mU/mg de proteína en el homogeneizado completo. Es decir, la enzima estaba incrementada en torno a 10 veces en las

preparaciones de microvasos. Igualmente, se evaluó la actividad en las ratas subnutridas y se obtuvieron valores similares:  $6,6 \pm 2$  mU/mg de proteína en las preparaciones de microvasos frente a  $0,7 \pm 0,06$  mU/mg de proteína en el homogeneizado de partida.

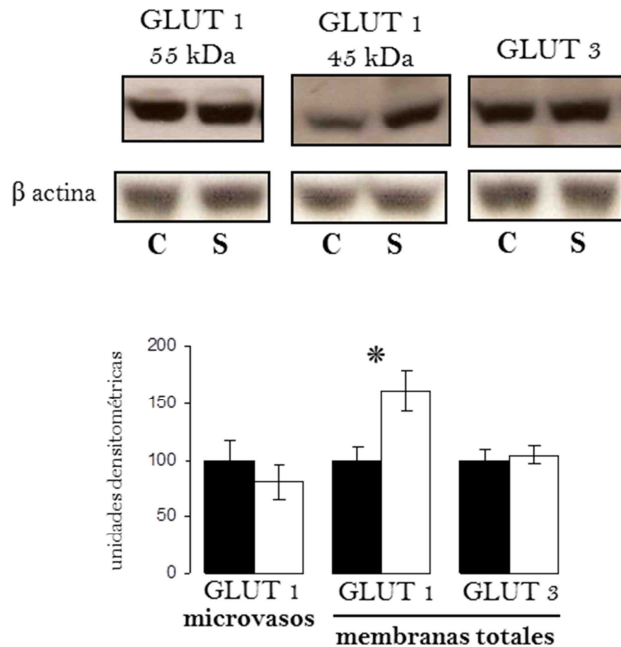


Fig. 21. Proteínas transportadoras de glucosa (GLUTs) en las preparaciones de microvasos y en los extractos de membranas crudas totales obtenidas de la corteza cerebral de ratas lactantes: C, controles; S, subnutridas. Los GLUTs se analizaron mediante Western Blot y las bandas se cuantificaron por densitometría. Las barras representan un valor medio  $\pm$  SEM de 6-7 determinaciones. Las barras negras corresponden a las ratas controles y las blancas a las subnutridas. En la parte superior de la figura se han incluido las autorradiografías representativas de cada caso. Las diferencias significativas se indican como: \* $p < 0,05$ .

Se analizaron las isoformas de GLUT 1 en las preparaciones de microvasos y de membrana cruda total. En las primeras, la única que se detectó fue la isoforma de 55 kDa y la subnutrición no indujo ningún cambio en ésta (Fig. 21).

En los extractos de membranas crudas, se analizaron GLUT 1 de 45 kDa y GLUT 3. La isoforma GLUT 1 de 45 kDa sólo se pudo visualizar tras exposiciones prolongadas, puesto que se encontraba muy diluida en la muestra. Como se ve en la Fig. 21, los niveles de GLUT 1 fueron más altos en las ratas subnutridas. Esta isoforma de 45 kDa se encuentra, principalmente, en los astrocitos. En cuanto a GLUT3, característica de neuronas, no se modificó por la subnutrición.

### 2.3.- Proteínas de la vía de señalización de la insulina

Se determinaron algunas proteínas de la vía de señalización de la insulina en la corteza cerebral de las ratas lactantes. En condiciones basales, no se encontraron diferencias en cuanto al receptor de insulina, IRS-1/2 y Akt entre los dos grupos de animales, controles y subnutridos (Fig. 22a).

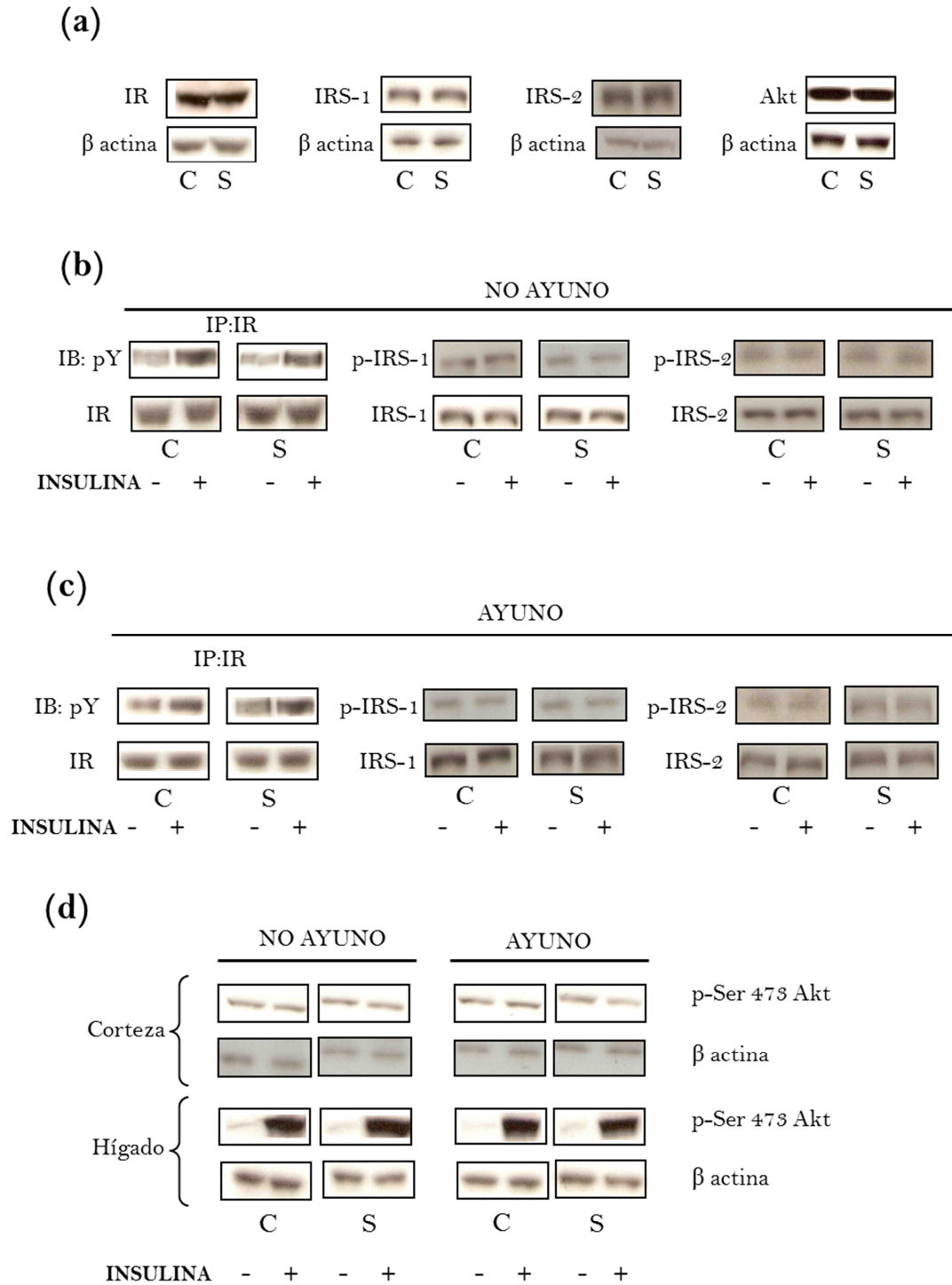
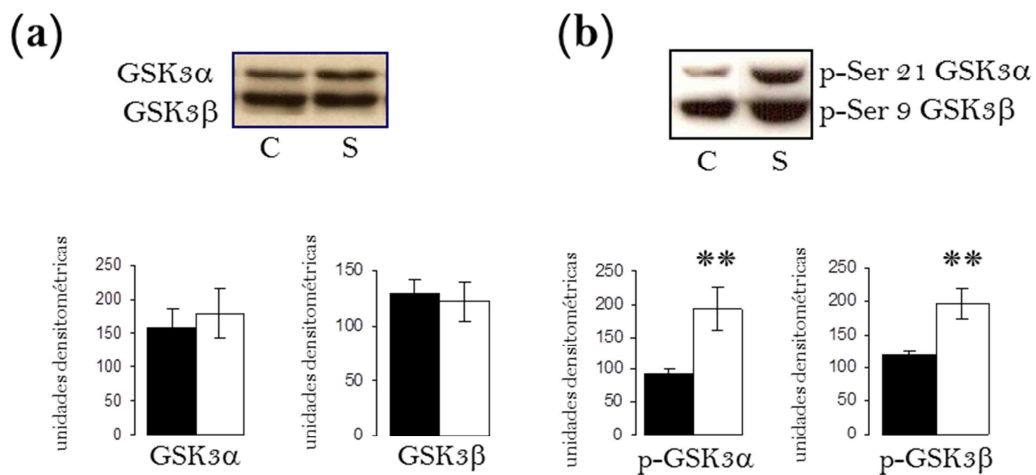


Fig. 22. Imágenes autorradiográficas, representativas de proteínas de la señal insulínica cortical en ratas lactantes. Los datos (no representados) se obtuvieron mediante densitometría de 6 determinaciones independientes. C, controles; S, subnutridos. (a) IR, IRS-1/2 y Akt. (b) Fosforilación de IR e IRS-1/2 en la condición no ayunada, después del tratamiento con insulina i.p. o suero salino. (c) Fosforilación de IR e IRS-1/2 en condiciones de ayuno, después del tratamiento con insulina i.p. o suero salino. (d) Akt fosforilado en corteza cerebral e hígado de ratas lactantes (ayunadas y no ayunadas), tras el tratamiento con insulina i.p. o suero salino. Solamente se observaron diferencias significativas en la fosforilación hepática de Akt entre la condición basal y tras el tratamiento de insulina.

Al administrar una dosis de insulina intraperitoneal de 5 mU/kg, se observó que los receptores de insulina incrementaron su fosforilación significativamente respecto de la condición basal ( $p < 0,001$ ) 5 minutos después de la inyección tanto en las ratas controles como en las subnutridas, independientemente de que estuvieran ayunadas o no (Figs. 22b y 22c). A pesar de esta estimulación del receptor, ni el grado de fosforilación de IRS-1/2 ni el de Akt se incrementaron por encima de los valores basales (Figs. 22b, 22c y 22d). Este resultado contrastó con lo que obtuvimos al analizar el hígado como tejido control. En éste, la cantidad de Akt fosforilada fue casi inapreciable en el estado basal pero experimentó un aumento muy importante con la administración de la insulina, tanto en las ratas controles como en las subnutridas e igualmente en la condición no ayunada y ayunada (Fig. 22d).

Con respecto a la GSK3 en la corteza cerebral, se identificaron sus dos isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , siendo ésta última la más abundante. La cantidad total de GSK3 no se alteró con la subnutrición (Fig. 23a). Sin embargo, las fosforilaciones en Ser21 y Ser9 de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente, estuvieron significativamente incrementadas en las ratas subnutridas, en estado basal: un 105% y un 66%, con relación a los valores controles (Fig. 23b).



**Fig. 23.** Western Blots de GSK3 (a) total y (b) fosforiladas en Ser 21 (GSK3  $\alpha$ ) y en Ser 9 (GSK3  $\beta$ ) en la corteza cerebral de ratas lactantes. Las barras representan los valores medios  $\pm$  SEM de 6-10 determinaciones independientes. Las barras negras corresponden a las controles y las blancas a las subnutridas. En la parte superior de la figura, se han incluido autorradiografías representativas en cada caso. Las diferencias entre controles y subnutridas fueron: \*\* $p < 0.01$ .

## 2.4.- AMPK y ACC

La cantidad total de AMPK presente en la corteza cerebral no se vio modificada con la subnutrición. Sin embargo, esta condición supuso una importante disminución del nivel de fosforilación de esta proteína en Thr172. De modo similar, estuvo reducida la fosforilación de la acetil coA carboxilasa (ACC), comparando, en ambos casos, con la población control (Fig. 24).

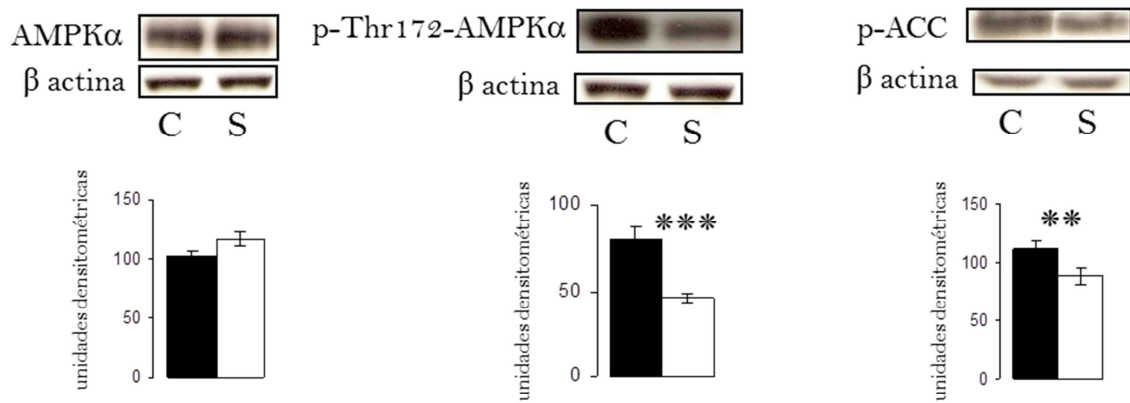


Fig. 24. Western Blots de AMPK $\alpha$  total, AMPK fosforilada en Thr172 y ACC fosforilada en la corteza cerebral de ratas lactantes. Las gráficas se representaron con los valores medios  $\pm$  SEM de 6 determinaciones independientes. Las barras negras corresponden a las ratas controles y las blancas a las subnutridas. En la parte superior de la figura, se han incluido autorradiografías. Las diferencias entre controles y subnutridas se han representado como: \*\*p < 0.01 y \*\*\*p < 0,001.

## 2.5.- Efecto de la subnutrición sobre las MAPKs y algunas proteínas de la vía apoptótica

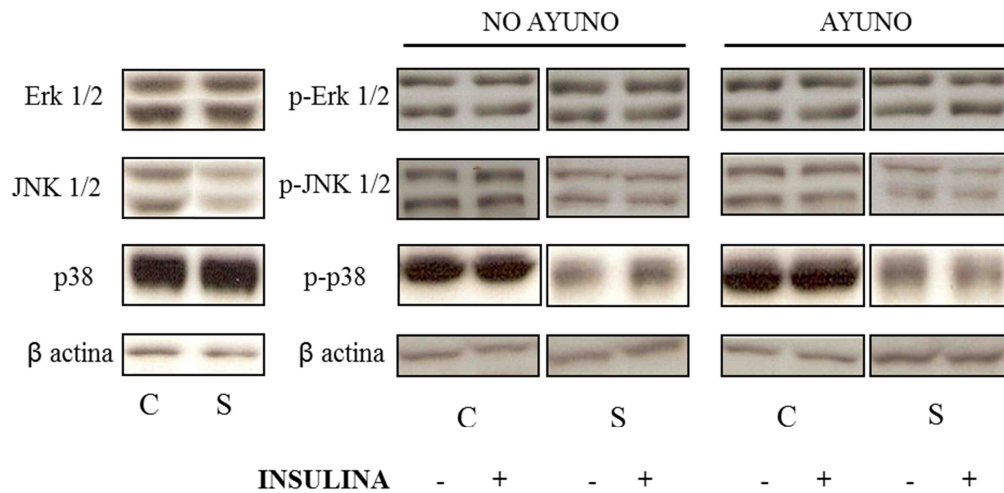


Fig. 25. Autorradiografías de las MAPKs analizadas en la corteza cerebral de ratas lactantes y de sus formas fosforiladas tras un tratamiento con insulina inyectada intraperitonealmente en condiciones de ayuno y no ayuno. Los resultados son representativos de 6-8 experimentos independientes.

Hemos analizado las MAPKs en el córtex de las ratas lactantes; se trata de proteínas mediadoras de procesos de crecimiento y desarrollo y forman parte de las vías de señalización de la insulina, además de intervenir en la respuesta al estrés. Los resultados de este análisis, efectuado en las condiciones de ayuno o nutrición, así como en estado basal o tras la administración de insulina, se muestran en la Fig. 25.

En primer lugar se observa que la subnutrición provocó un ligero descenso de la expresión total de JNK-1/2, sin que se afectasen las cantidades de ERK-1/2 ni de p38. Otro resultado destacable es que la insulina no indujo cambios en el grado de fosforilación previo (es decir: basal) en estas tres MAPKs, en ninguna de las condiciones estudiadas (controles, subnutridas, ayunadas y no ayunadas). En todas estas condiciones, sin embargo, observamos que en el córtex de las ratas subnutridas la fosforilación de JNK así como la de p38 estuvieron por debajo de los valores controles. Dado que estas MAPKs pueden influir sobre la apoptosis, el resultado anterior sugería la posibilidad de que la subnutrición causara alteraciones en esa vía. Por ello efectuamos una primera aproximación a esta cuestión, analizando algunas de las proteínas que regulan o

intervienen en ese proceso de muerte celular. Se trata de proteínas de la familia de Bcl2, así como la caspasa 3. Los resultados de ese estudio se presentan en la Fig. 26.

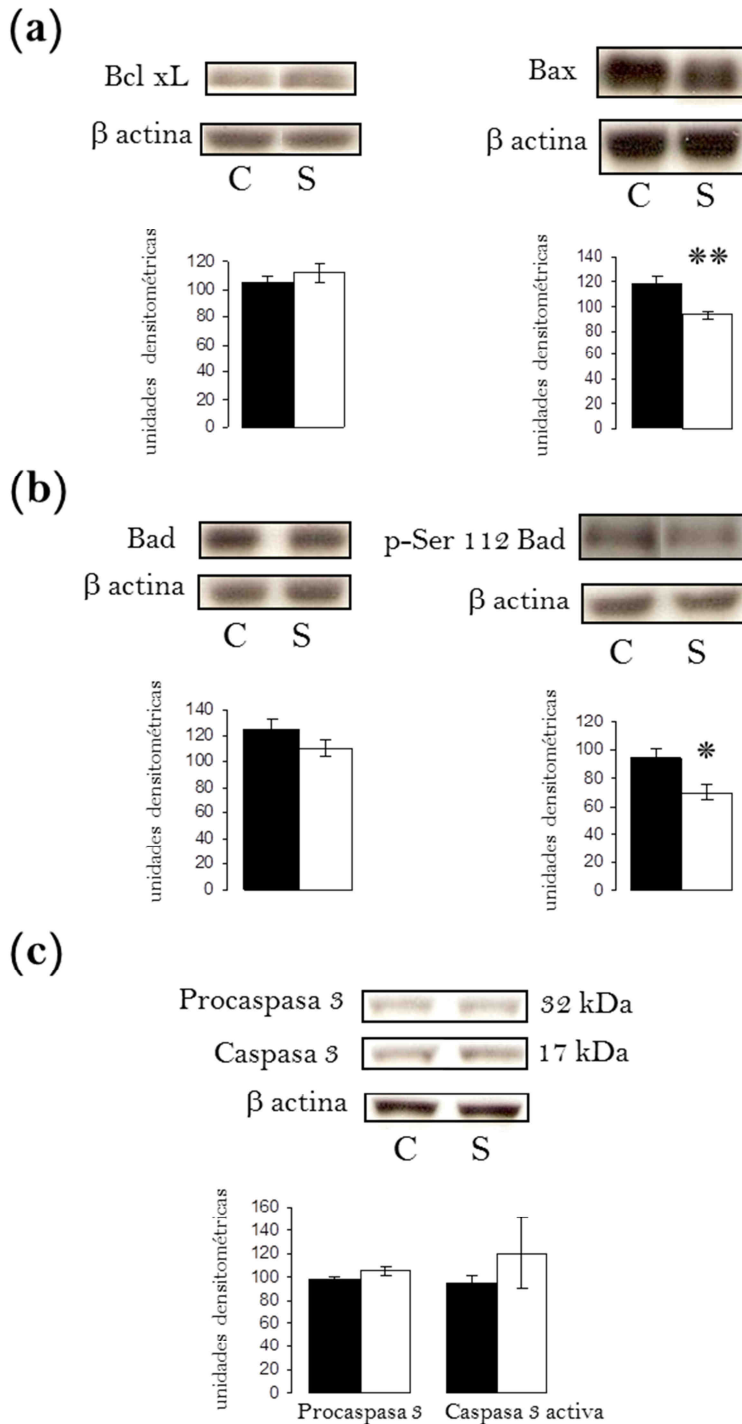
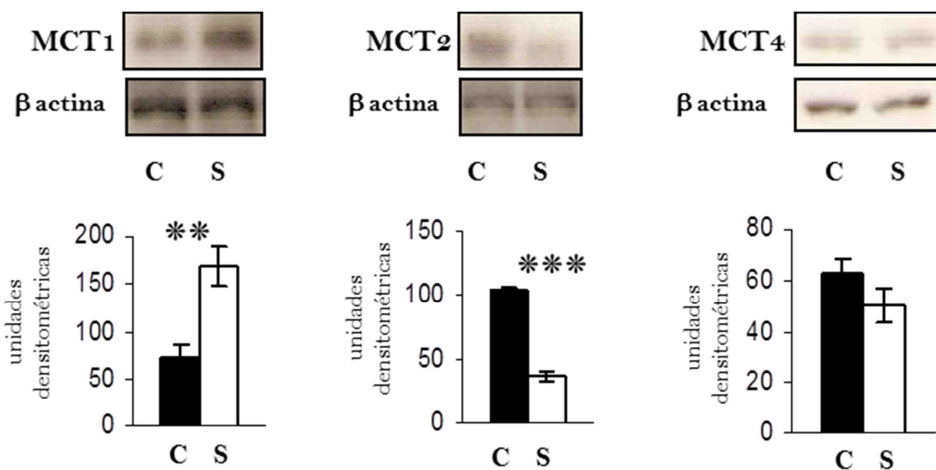


Fig. 26. Contenido de algunas proteínas implicadas en la muerte por apoptosis de las células corticales en ratas controles (C) y subnutridas (S). Bcl-xL, Bax (a), Bad, Bad fosforilada en Ser 112 (b), procaspasa 3 y caspasa 3 (c) fueron cuantificadas mediante Western Blot. Los resultados representan los valores medios  $\pm$  SEM de 6 - 8 determinaciones independientes. Las barras negras corresponden a controles y las blancas a subnutridas. En la parte superior de las gráficas, se han incluido autorradiografías representativas. Las diferencias entre controles y subnutridas fueron: \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ .

Como se observa en ella, la subnutrición no tuvo efectos sobre el contenido cortical de las proteínas Bcl-xL (anti-apoptótica) y Bad (pro-apoptótica) (Figs. 26a y 26b, respectivamente). La versión fosforilada de Bad en Ser112, que es una especie promotora de supervivencia, se encontró reducida en las ratas subnutridas (Fig. 26b). En estos animales también disminuyó la cantidad de Bax, factor pro-apoptótico (Fig. 26a). En el córtex de esas ratas subnutridas, tanto la cantidad de procaspasa 3 como la de su forma activada (tras proteólisis), caspasa 3, permanecieron dentro de los niveles controles (Fig. 26c).

## 2.6.- Enzimas de utilización de cuerpos cetónicos y transportadores de monocarboxilatos en la corteza cerebral

Hemos analizado la actividad de las enzimas implicadas en la utilización de los cuerpos cetónicos en la corteza cerebral de ambos grupos de ratas: 3-hidroxibutirato deshidrogenasa, 3-oxoacil-Co-A transferasa y acetoacetyl-CoA tiolasa. No se encontraron diferencias significativas en estas actividades si comparamos controles frente a subnutridos:  $14 \pm 1$  vs.  $12 \pm 0,5$  nmol/min/mg (deshidrogenasa);  $5 \pm 0,4$  vs.  $4 \pm 0,8$  nmol/min/mg (transferasa), y  $14 \pm 2$  vs.  $16 \pm 2$  nmol/min/mg (tiolasa). El análisis de estas actividades está detallado en la sección 4.1 de Materiales y Métodos.



**Fig. 27.** Transportadores de monocarboxilatos: MCT1, MCT2 y MCT4 en la corteza cerebral de ratas lactantes. C, controles; S, subnutridas. Las barras (negras, controles; blancas, subnutridas) representan las medias  $\pm$  SEM de 6-8 cuantificaciones densitométricas independientes. En la parte superior de las gráficas, se han incluido autorradiografías representativas de cada caso. Las diferencias entre los grupos C y S fueron: \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

También se midieron los efectos de la subnutrición sobre el contenido de varios transportadores de monocarboxilatos: MCT-1 (específico de microvasos), MCT-2

(ubicuo) y MCT4 (células gliales). Se observó que la restricción nutricional aumentaba el contenido de MCT-1, reducía el de MCT-2 y no ejercía efecto alguno sobre el MCT-4 (Fig. 27).

### 3.- Estudio de los efectos de la realimentación con dieta hiperlipídica en ratas subnutridas

Ratas Wistar hembras de 70 días de vida de ambas condiciones nutricionales (subnutridas y controles) se sometieron a una realimentación con dieta de cafetería hasta los 9 meses, tal y como se ha indicado en la sección 1.5 de Materiales y Métodos.

#### 3.1.- Evolución del peso corporal

Como se refleja en la Fig. 28, cuando las ratas controles se sometieron a la dieta de cafetería aumentaron su peso un 10% con respecto a las que se mantuvieron con el alimento estándar.

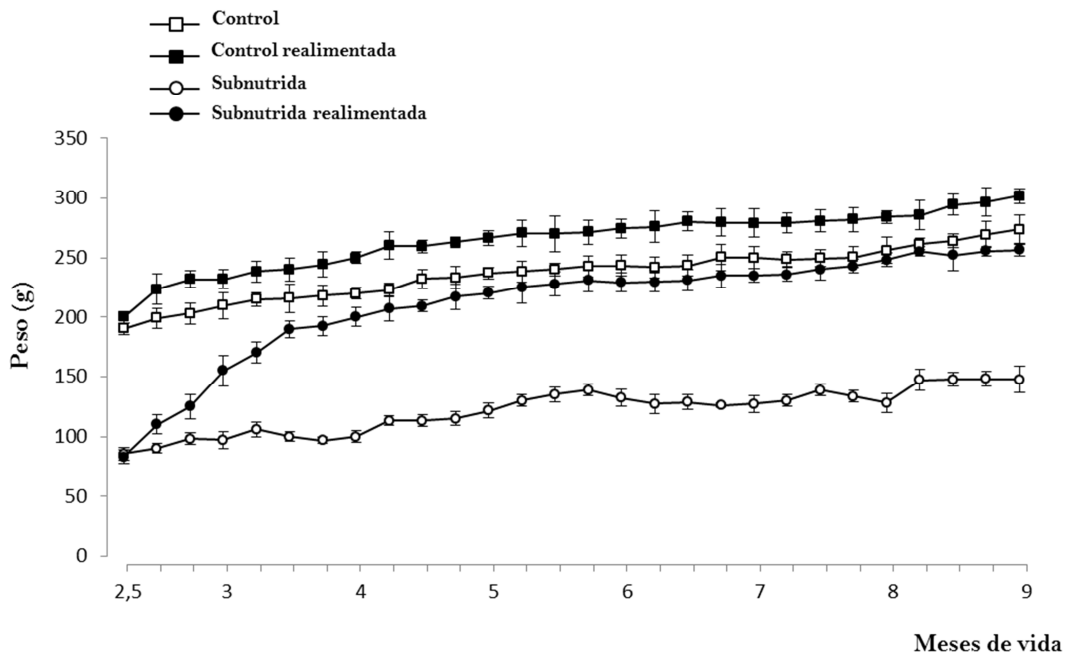


Fig. 28. Peso corporal de los animales entre los 70 días y los 9 meses. Cada punto representa las medias  $\pm$  SEM de los pesos de 6-8 ratas.

El peso de los animales que siguieron siempre subnutridos fue un 55% más bajo que el de las ratas controles. Cuando las ratas subnutridas se transfirieron a la dieta de cafetería

se incrementó su peso rápidamente durante las primeras 5 semanas y más lentamente a continuación; a los 9 meses, el peso de estos animales alcanzó el correspondiente al de las controles siempre bajo dieta estándar (Fig. 28).

### 3.2.- Ingestas

La ingesta de los animales subnutridos y después realimentados con la dieta de cafetería fue muy similar a la de las ratas controles que comieron pienso estándar. Sin embargo, las ratas controles transferidas a dicha dieta ingirieron una cantidad menor (Fig. 29).

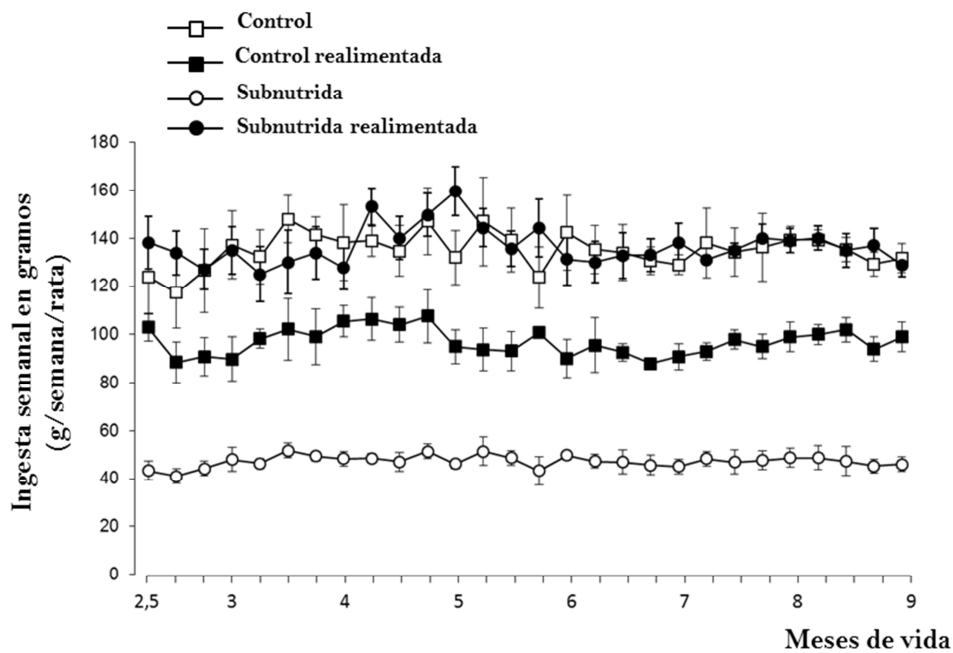


Fig. 29. Ingesta semanal en peso durante los 6,5 meses en que se administró la dieta de cafetería. Cada punto en la gráfica representa las medias  $\pm$  SEM de las ingestas semanales de 6-8 animales.

En cuanto a la ingesta expresada en calorías, las ratas subnutridas realimentadas con la dieta hipercalórica consumieron una cantidad mayor que las ratas controles y que la ingerida por las controles realimentadas. Estas últimas regularon espontáneamente la cantidad de calorías que ingerían, de modo que fue la misma que la correspondiente a las ratas controles que siempre dispusieron de pienso estándar (Fig. 30).

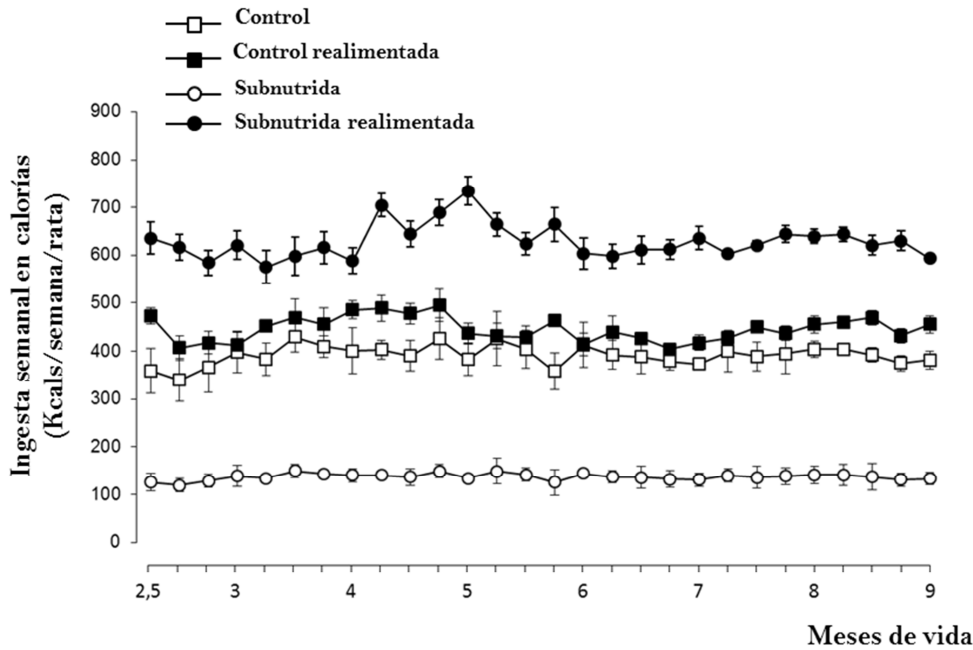


Fig. 30. Ingesta semanal en calorías, durante los 6,5 meses en que se administró la dieta de cafetería. Cada punto en la gráfica representa las medias  $\pm$  SEM de las ingestas de 6-8 animales.

### 3.3.- Características antropométricas

Antes del inicio de la realimentación (70 días) y al término de ésta (9 meses) se determinaron varios parámetros antropométricos obteniendo los resultados que están reflejados en la Tabla 6.

#### 3.3.1.- Peso

Las ratas de 70 días subnutridas presentaron aproximadamente un 50% menos de masa corporal que sus controles. A los 9 meses, estas últimas aumentaron su peso en un 30%; mientras que los animales que permanecieron bajo la restricción nutricional, lo incrementaron en un 47%. Sin embargo, permaneció por debajo del de sus controles de la misma edad e incluso del correspondiente a los controles de 70 días. Los animales controles sometidos a la dieta de cafetería aumentaron su peso en un 10%, mientras que los subnutridos realimentados lo hicieron en un 60%. Por tanto, la masa corporal de estos últimos no se llegó a igualar a la de los controles de cafetería.

	CONTROLES			SUBNUTRIDAS		
	C70d	C9m	C9mCaf	S70d	S9m	S9mCaf
Peso corporal (g)	188±2 <sup>a</sup>	243±5 <sup>b</sup>	271±5 <sup>c</sup>	97±4 <sup>d</sup>	143±4 <sup>e</sup>	231±7 <sup>b</sup>
Longitud naso-anal (cm)	19,6±0,2 <sup>a</sup>	23,5±0,3 <sup>b</sup>	23,6±0,2 <sup>b</sup>	15,7±0,2 <sup>c</sup>	20,6±0,2 <sup>d</sup>	23,2±0,2 <sup>b</sup>
Diámetro abdominal (mm)	70,4±1,6 <sup>a</sup>	70,8±2,9 <sup>a</sup>	80±1,7 <sup>b</sup>	38±1 <sup>c</sup>	56,9±1,4 <sup>d</sup>	71,9±1,8 <sup>a</sup>
Diámetro torácico (mm)	35,8±1,3 <sup>a</sup>	34,3±0,7 <sup>a</sup>	37,3±0,3 <sup>b</sup>	19,4±0,7 <sup>c</sup>	33,2±0,6 <sup>a</sup>	35,3±0,5 <sup>a</sup>
Índice de masa corporal (IMC) (kg/m <sup>2</sup> )	4,5±0,1 <sup>a</sup>	4,4±0,1 <sup>a</sup>	4,9±0,1 <sup>b</sup>	4,7±0,2 <sup>a</sup>	3,4±0,2 <sup>c</sup>	4,3±0,1 <sup>a</sup>
Índice de Lee (g <sup>1/3</sup> /m)	28±0,2 <sup>a</sup>	26±0,3 <sup>a</sup>	27±0,1 <sup>a</sup>	31±0,6 <sup>b</sup>	25±0,4 <sup>a</sup>	26±0,3 <sup>a</sup>
Glucosa en suero (mg/100mL)	80±3 <sup>a</sup>	89±6 <sup>a</sup>	95±3 <sup>a</sup>	81±3 <sup>a</sup>	81±8 <sup>a</sup>	81±3 <sup>a</sup>
Insulina en suero (ng/mL)	2±0,3 <sup>a</sup>	2,8±0,6 <sup>a</sup>	2±0,6 <sup>a</sup>	0,5±0,1 <sup>b</sup>	2,2±0,4 <sup>a</sup>	0,9±0,1 <sup>c</sup>
Triglicéridos en suero (mg/100mL)	40±4 <sup>a</sup>	50±4 <sup>a,b</sup>	53±2 <sup>b</sup>	30±2 <sup>c</sup>	34±4 <sup>c</sup>	67±6 <sup>d</sup>
Colesterol total en suero (mg/100mL)	62±2 <sup>a</sup>	63±3 <sup>a</sup>	62±3 <sup>a</sup>	71±3 <sup>c</sup>	56±5 <sup>a</sup>	78±2 <sup>b</sup>

**Tabla 6. Parámetros antropométricos, niveles de glucosa, insulina, triglicéridos y colesterol en suero. Medias ± SEM de 6-8 cuantificaciones independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas de al menos  $p < 0,05$ .**

### 3.3.2.- Distancia naso-anal

La distancia naso-anal es una medida aceptada para evaluar el tamaño de una rata. En la Tabla 6 se puede observar que las ratas controles siguieron creciendo desde los 70 días hasta los 9 meses; y que la dieta de cafetería no ocasionó un mayor crecimiento. Las ratas subnutridas de 70 días presentaron una longitud un 20% menor que la de sus controles de la misma edad. Tras 6,5 meses adicionales de restricción alcanzaron la distancia naso-anal de las controles de 70 días pero no la de las controles de 9 meses. Sin embargo, tras la realimentación hiperlipídica tanto las subnutridas como las controles presentaron la misma longitud.

### 3.3.3.- Diámetros abdominal y torácico

El diámetro abdominal no se modificó en las ratas controles entre los 70 días y 9 meses. Las ratas subnutridas presentaron un diámetro abdominal más bajo que sus controles en las dos edades. Tras la dieta de cafetería, tanto en las ratas controles como en las subnutridas se incrementó este parámetro en un 13% y 26%, respectivamente, en relación a sus correspondientes grupos no rehabilitados. Las ratas subnutridas realimentadas alcanzaron finalmente un diámetro abdominal ligeramente inferior al de las correspondientes controles de 9 meses bajo dieta de cafetería.

El diámetro torácico tampoco cambió entre las ratas controles de 70 días y 9 meses. Sin embargo, tras la administración de la mezcla hipercalórica, dicho diámetro aumentó un 13%. El grupo de subnutridas de 70 días presentó un diámetro torácico disminuido en un 46% respecto del valor de sus controles, y se incrementó alcanzando el valor control a los 9 meses. La transferencia a la dieta de cafetería no implicó un cambio significativo de este parámetro, que quedó ligeramente por debajo del valor control (como en el caso del diámetro abdominal).

### **3.3.4.- Índice de masa corporal**

El índice de masa corporal (IMC) se obtuvo dividiendo el peso del animal en kilogramos por el cuadrado de su longitud naso-anal en metros. No se encontraron diferencias entre las ratas controles de 70 días de vida y las de 9 meses. Se produjo un aumento significativo del 10% en las ratas controles realimentadas respecto de las no rehabilitadas. En el caso de las ratas subnutridas, las de 70 días presentaron un IMC equivalente al de los animales alimentados con pienso estándar. Tras prolongar la restricción nutricional hasta los 9 meses, presentaron un IMC significativamente inferior al de todos los demás grupos. En las ratas subnutridas rehabilitadas, el IMC se incrementó, aunque permaneció por debajo del valor correspondiente al de las ratas controles rehabilitadas.

### **3.3.5.- Índice de Lee**

El índice de Lee es otro parámetro que relaciona el peso del cuerpo con la longitud. Se obtiene dividiendo la raíz cúbica del peso de la rata (en gramos) por su longitud naso-anal (en metros) (Lee, 1929). Encontramos valores similares de este parámetro en todas las poblaciones, excepto en las subnutridas de 70 días de vida, que presentaban un índice un 11% más alto.

## **3.4.- Glucemia e insulinemia**

La concentración de glucosa en suero fue similar en los seis grupos de ratas estudiados. En los grupos controles, la concentración sérica de insulina tampoco presentó diferencias. Sin embargo, en las ratas subnutridas de 70 días de vida se observaron unos valores muy disminuidos que aumentaron a los 9 meses hasta alcanzar

la concentración normal. Cuando estas ratas se transfirieron a la dieta de cafetería volvieron a experimentar hipoinsulinemia.

### **3.5.- Trigliceridemia y colesterolemia**

No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de triglicéridos entre las ratas controles de 70 días y las de 9 meses. Las ratas subnutridas de 70 días presentaron valores un 25% más bajos que sus controles de la misma edad. Cuando la subnutrición se prolongó hasta los 9 meses, los triglicéridos permanecieron bajos. Tras la realimentación con la dieta de cafetería, en las ratas previamente restringidas los triglicéridos se duplicaron. En cambio, entre las poblaciones controles alimentadas con los dos tipos de dietas no se produjeron diferencias significativas.

La concentración de colesterol en suero fue similar en todos los grupos de ratas controles. En cambio, en las subnutridas de 70 días estaba incrementada en un 15%. Al prolongar la restricción hasta los 9 meses, el nivel de colesterol disminuyó hasta el valor control; sin embargo, la transferencia de las ratas subnutridas a la dieta de cafetería indujo un aumento significativo del 40%.

### **3.6.- Análisis cuantitativo del tejido adiposo blanco**

Mediante los estudios de RMN se evaluó el contenido de tejido adiposo blanco en los diferentes tipos de ratas. Se obtuvieron imágenes que fueron procesadas según se indica en la sección 11.1 de Materiales y Métodos. En la Fig. 31, se muestran varias de éstas, representativas de cada uno de los grupos de animales analizados. Se han elegido los cortes longitudinales centrales; en ellos, las partes amarillas corresponden a la grasa blanca acumulada. En la parte superior, se muestran las ratas controles y en la inferior las subnutridas. Como se puede apreciar, el acúmulo de grasa aumentó notablemente al realimentar con la dieta de cafetería. También se observa el bajo contenido de tejido adiposo blanco presente en las ratas subnutridas en comparación con sus correspondientes controles.

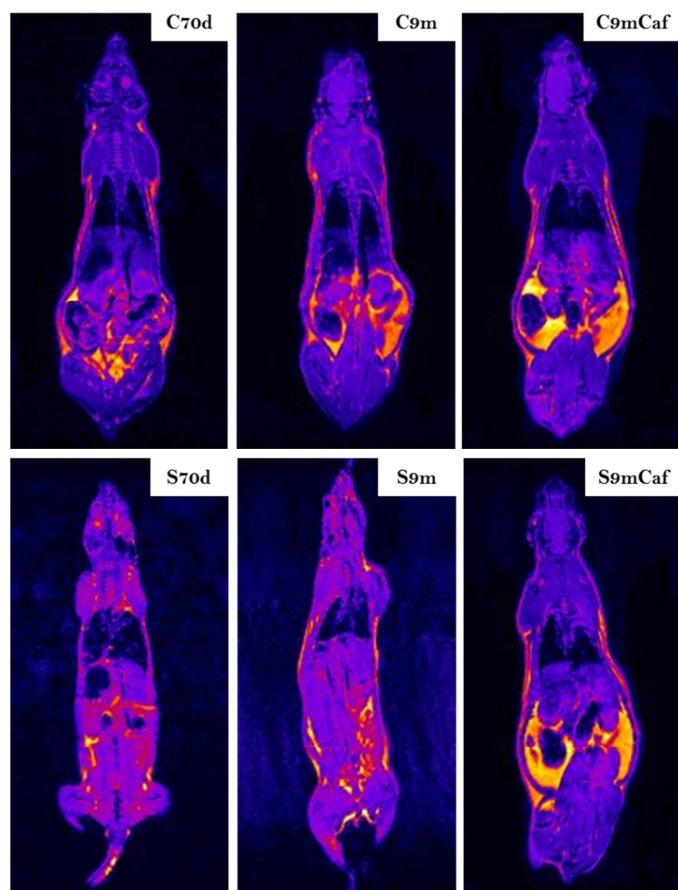


Fig. 31. Imágenes representativas de las 6 poblaciones de ratas analizadas mediante RMN. Cada imagen se corresponde con el corte longitudinal central emitido por el espectrómetro (Bruker Biospec 47/40). En la parte superior, se muestran las ratas controles y en la inferior las subnutridas, en ambos casos a los 70 días y 9 meses.

Los distintos depósitos grasos observados en la imagen de cada animal se cuantificaron individualmente y los datos se trataron estadísticamente. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

	CONTROLES			SUBNUTRIDAS		
	C70d	C9m	C9mCaf	S70d	S9m	S9mCaf
Grasa corporal total (g)	17 ± 2 <sup>a</sup>	24 ± 1 <sup>b</sup>	36 ± 1 <sup>c</sup>	5 ± 0,5 <sup>d</sup>	12 ± 1 <sup>e</sup>	21 ± 3 <sup>a,b</sup>
% Adiposidad	9,5 ± 1 <sup>a</sup>	10 ± 0,4 <sup>a</sup>	13 ± 0,7 <sup>b</sup>	6 ± 0,4 <sup>c</sup>	8,5 ± 1 <sup>a,c</sup>	9 ± 1,3 <sup>a,c</sup>
Grasa visceral (g)	9,5 ± 1 <sup>a</sup>	13,5 ± 2 <sup>b</sup>	20 ± 2 <sup>c</sup>	2,1 ± 0,2 <sup>d</sup>	2,5 ± 0,5 <sup>d</sup>	13 ± 2 <sup>a,b</sup>
Grasa visceral relativa al peso corporal (%)	5,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,5 <sup>a,b</sup>	7 ± 1 <sup>b</sup>	2,7 ± 0,2 <sup>c</sup>	2 ± 1 <sup>c</sup>	5,5 ± 1 <sup>a,b</sup>
Grasa visceral relativa a la grasa total (%)	57 ± 2 <sup>a</sup>	55 ± 6 <sup>a</sup>	54 ± 4 <sup>a</sup>	44 ± 3 <sup>b</sup>	21 ± 3 <sup>c</sup>	60 ± 1 <sup>a</sup>
Grasa subcutánea (g)	7 ± 0,6 <sup>a</sup>	10 ± 1 <sup>a,b</sup>	13 ± 2 <sup>b,c</sup>	2,6 ± 0,3 <sup>d</sup>	9 ± 1 <sup>a,b</sup>	8 ± 1 <sup>a,b</sup>
Grasa subcutánea relativa al peso corporal (%)	4 ± 0,3 <sup>a</sup>	4 ± 0,6 <sup>a</sup>	5 ± 1 <sup>a,b</sup>	3 ± 0,3 <sup>a</sup>	6 ± 1 <sup>b</sup>	3 ± 0,5 <sup>a</sup>
Grasa subcutánea relativa a la grasa total (%)	43 ± 3 <sup>a</sup>	40 ± 6 <sup>a</sup>	36 ± 3 <sup>b</sup>	52 ± 4 <sup>c</sup>	72 ± 3 <sup>d</sup>	36 ± 1 <sup>b</sup>

Tabla 7. Grasa corporal total, visceral y subcutánea. Medias ± SEM de 6 cuantificaciones independientes. Ratas controles y subnutridas de 70 días: C70d y S70d; de 9 meses: C9m y S9m. Realimentadas con la dieta de cafetería: C9mCaf y S9mCaf. Letras diferentes indican diferencias significativas de al menos  $p < 0,05$ .

### 3.6.1.- Grasa total

El contenido total de grasa de los animales subnutridos estuvo marcadamente disminuido tanto a los 70 días como a los 9 meses, siendo el 30% y 50%, respectivamente, del que presentaron los controles de la misma edad. Durante ese periodo de tiempo, en estos últimos se produjo un aumento del 40% de la grasa corporal, mientras que en las ratas subnutridas el incremento fue del 140%. Como es lógico, la transferencia a la dieta de cafetería supuso una ganancia extra de grasa en ambas poblaciones, aunque en proporciones diferentes: aumentó unas 2 veces en las controles, pero más de 4 veces en las subnutridas.

La adiposidad de las ratas controles (porcentaje de grasa en función del peso corporal) no se modificó en el intervalo comprendido entre 70 días y 9 meses; este parámetro estaba disminuido en las subnutridas de 70 días y se incrementó durante ese periodo hasta igualar el valor control. La dieta de cafetería indujo un incremento en las ratas controles, pero no en las subnutridas.

### 3.6.2.- Grasa visceral

La cantidad absoluta de grasa visceral estaba muy reducida en las ratas restringidas de 70 días, casi 5 veces por debajo del valor control. En las controles, los depósitos de este tipo de grasa se incrementaron con el tiempo, lo que no ocurrió en las subnutridas. La transferencia a la dieta de cafetería supuso una ganancia adicional de grasa visceral pero en proporciones muy diferentes: aumentó unas 2 veces en las ratas controles y más de 5 veces en las subnutridas. Debido a ello, mientras que en las primeras esto supuso un incremento proporcional de la grasa visceral acumulada con respecto al peso del cuerpo del orden del 30%, en las subnutridas este incremento fue aproximadamente del 100%. El notable efecto de la dieta de cafetería sobre este tipo de grasa en las ratas subnutridas se aprecia mejor cuando se valora su proporción en relación con el contenido graso total del cuerpo. Este parámetro se mantuvo constante en las ratas controles, sin modificaciones relacionadas con la edad o con la dieta hiperlipídica. En cambio, en las ratas subnutridas dicha proporción se redujo a la mitad entre los 70 días y 9 meses, pero se incrementó en un 35% bajo la dieta de cafetería.

### **3.6.3.- Grasa subcutánea**

La subnutrición repercutió sobre la cantidad de grasa subcutánea de las ratas de 70 días, que experimentaron una reducción del 60% con respecto a sus controles. Curiosamente, a pesar de mantener la restricción nutricional hasta los 9 meses, la cantidad absoluta de este tipo de grasa fue aumentando, de manera que a esa edad ya no hubo diferencias con respecto a la grasa subcutánea evaluada en las ratas controles. La transferencia a la dieta hiperlipídica no modificó la cantidad absoluta de esta grasa en ninguna de las dos poblaciones de animales. Con relación al peso del cuerpo, la proporción de grasa subcutánea no cambió en las ratas controles, ni con la edad ni con la dieta de cafetería. En el caso de las subnutridas, la evolución fue diferente, ya que esa proporción aumentó significativamente a los 9 meses cuando se mantuvieron bajo restricción, pero no cuando se alimentaron con la dieta hiperlipídica.

Los hechos más destacables que se deducen al considerar la proporción específica de tejido adiposo subcutáneo con respecto a la cantidad total de grasa son: la subnutrición aumentó esa proporción, como se observó a los 70 días y a los 9 meses; por otra parte, la ingesta de la dieta hiperlipídica provocó una reducción del contenido relativo de dicho tipo de tejido.

### **3.7.- Grasa ectópica**

Para determinar la concentración de lípidos ectópicos se extrajo la grasa total del hígado, músculo esquelético y corazón y en el extracto obtenido se analizó el contenido específico de triglicéridos y colesterol, como se describe en la sección 3.10 de Materiales y Métodos. Los resultados, expresados en función de la proteína tisular, se presentan en la Tabla 8.

El contenido hepático de triglicéridos de las ratas controles no experimentó cambios asociados a la edad o a la dieta de cafetería. Estos resultados contrastan con los obtenidos en las ratas subnutridas; en el hígado de éstas, los triglicéridos estaban reducidos en un 50% y con la dieta hiperlipídica su concentración se multiplicó prácticamente por 3. En cuanto al colesterol hepático, el hecho más destacable fue la ausencia de diferencias cuantitativamente importantes entre los diversos grupos de ratas.

	CONTROLES			SUBNUTRIDAS		
	C70d	C9m	C9mCaf	S70d	S9m	S9mCaf
Triglicéridos en hígado ( $\mu\text{g}/\text{mg prot}$ )	11 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	11 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	12 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	6 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	5 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	19 $\pm$ 1 <sup>c</sup>
Colesterol en hígado ( $\mu\text{g}/\text{mg prot}$ )	4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	3 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
Triglicéridos en músculo ( $\mu\text{g}/\text{mg prot}$ )	4 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	6 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	5 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	7 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	7 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	20 $\pm$ 3,9 <sup>b</sup>
Colesterol en músculo ( $\mu\text{g}/\text{mg prot}$ )	1,2 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	1,6 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	1,7 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,6 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
Triglicéridos en corazón ( $\mu\text{g}/\text{mg prot}$ )	8 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	6 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	5,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	13 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>	6 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	6 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
Colesterol en corazón ( $\mu\text{g}/\text{mg prot}$ )	4 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	4 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	5 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	5 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	4 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
Ácido úrico en hígado ( $\mu\text{g}/\text{mg prot}$ )	1,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,8 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	0,7 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	2,5 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>

**Tabla 8. Contenidos de triglicéridos y colesterol en hígado, músculo esquelético y músculo cardíaco. Contenido de ácido úrico en hígado. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 6-8 determinaciones independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas de al menos  $p < 0,05$ .**

En el músculo esquelético de las ratas controles, las concentraciones de triglicéridos y de colesterol se mantuvieron constantes en las distintas condiciones estudiadas. Sin embargo, la subnutrición implicó un aumento de los triglicéridos; cuando estas ratas subnutridas se realimentaron con la dieta de cafetería, el depósito muscular de estos lípidos se incrementó en casi 3 veces. En cambio no hubo grandes modificaciones en relación con el contenido de colesterol.

Los cambios con la edad o la dieta observados en los triglicéridos o el colesterol en el músculo cardíaco fueron de escasa o nula relevancia en ambos tipos de ratas y lo mismo cabe decir del colesterol en las ratas subnutridas; sin embargo, el contenido de triglicéridos en el corazón de estas últimas se encontró aumentado a los 70 días, descendiendo al nivel normal a los 9 meses con independencia del tipo de dieta.

### 3.8.- Ácido úrico en el hígado

Como se ve en la Tabla 8, el contenido hepático de ácido úrico fue prácticamente invariable en las ratas controles a las distintas condiciones estudiadas. En las subnutridas estaba disminuido casi en un 50% pero cuando estas ratas se transfirieron a la dieta de cafetería el ácido úrico experimentó un incremento muy significativo, quedando por encima de los valores controles.

### 3.9.- Efectos de la subnutrición y realimentación sobre la leptinemia

La concentración de leptina en suero se analizó mediante ELISA sándwich, según está descrito en la sección 3.6 de Materiales y Métodos.

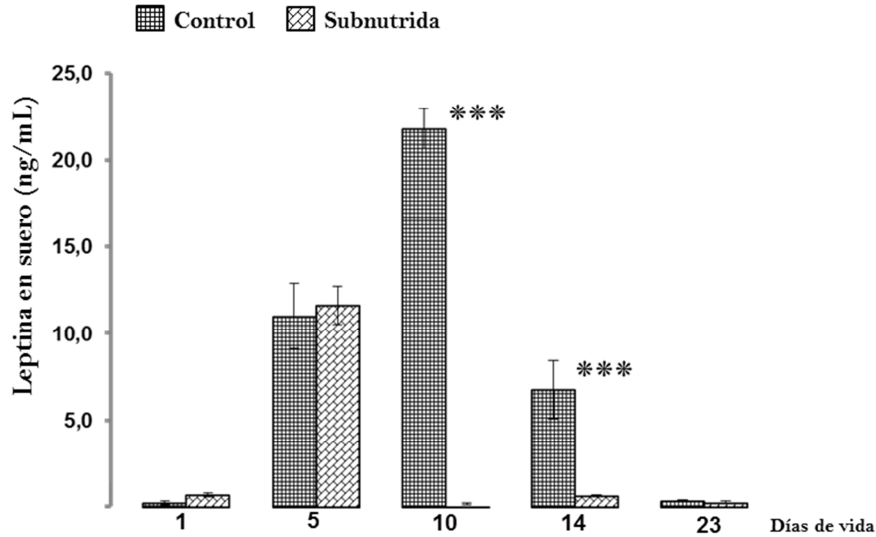


Fig. 32. Leptinemia en ratas controles y subnutridas durante la lactancia. Las barras representan las medias  $\pm$  SEM de 6-8 determinaciones independientes. Las diferencias significativas entre controles y subnutridas, en cada grupo de edad, se reflejaron como: \*\*\* $p < 0,001$ .

Durante la etapa lactante, la leptinemia se incrementó progresivamente en las ratas controles, alcanzando un pico a los 10 días.

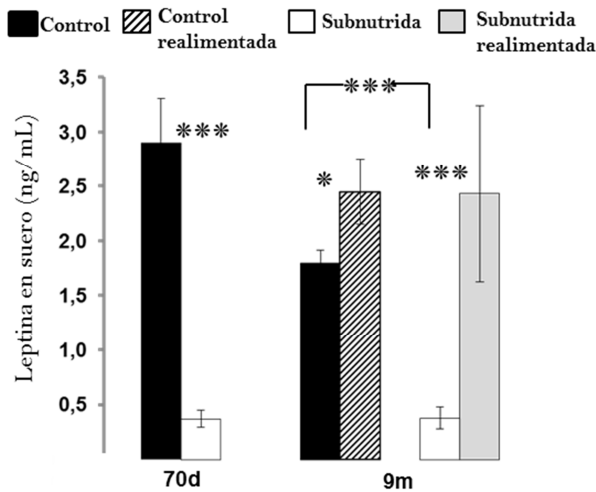


Fig. 33. Leptinemia en ratas controles, subnutridas y realimentadas de 70 y 9 meses de vida. Las barras representan las medias  $\pm$  SEM de 6-8 determinaciones independientes. Las diferencias significativas entre controles y subnutridas, en cada grupo de edad, se reflejaron como: \*\*\* $p < 0,001$ . La diferencia entre controles y controles realimentadas de 9 meses (C9m vs. C9mCaf) se reflejó como: \* $p < 0,05$ ; mientras que la diferencia entre subnutridas y subnutridas realimentadas (S9m vs. S9mCaf) fue: \*\*\* $p < 0,001$ .

A continuación disminuyó, siendo casi indetectable en la etapa del destete. Este perfil fue muy diferente en las ratas subnutridas; en éstas no se produjo el pico y la leptinemia ya fue casi indetectable a los 10 días de vida (Fig. 32).

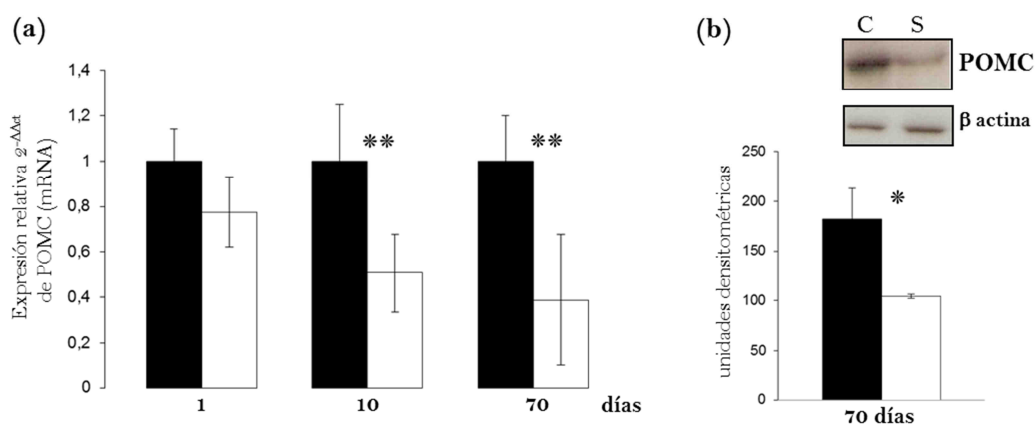
En las ratas subnutridas adultas, la leptinemia fue significativamente menor que en sus controles, tanto a los 70 días como a los 9 meses. Con la transferencia a la dieta de cafetería el nivel sérico de leptina aumentó en los dos grupos de animales; el aumento fue muy superior en los que habían sido previamente subnutridos, cuya leptinemia se igualó al dato control (Fig. 33).

### 3.10.- Efectos de la subnutrición sobre el hipotálamo

Para explicar las diferencias en el comportamiento alimentario de las ratas subnutridas y sus controles al ser transferidas a la dieta de cafetería, estudiamos el efecto de la restricción sobre la expresión y el contenido de dos neuropéptidos hipotalámicos que son cruciales en la regulación del apetito: POMC, de acción anorexigénica y NPY, fuertemente orexigénico. A continuación se evaluó la sensibilidad del hipotálamo a dos hormonas con acción supresora del apetito: insulina y leptina.

#### 3.10.1- Expresión y contenido de POMC

La expresión de este neuropéptido se evaluó mediante qRT-PCR (sección 10 de Materiales y Métodos).

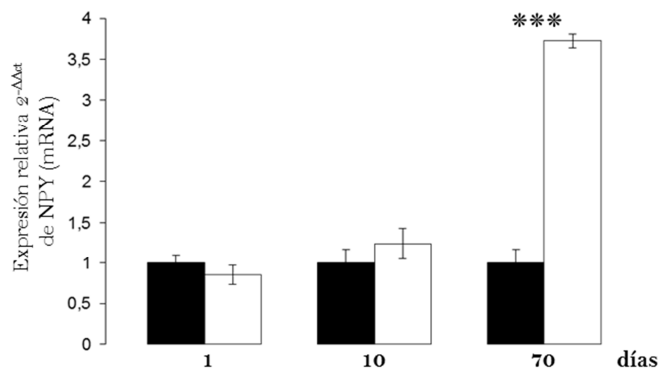


**Fig. 34.** Expresión (a) y contenido (b) de POMC en el hipotálamo de ratas controles (C) y subnutridas (S) durante la lactancia y en la etapa adulta. Se presenta también un autorradiograma representativo. Las barras (negras, controles; blancas, subnutridas) corresponden a las medias  $\pm$  SEM de 6-8 determinaciones independientes. Las diferencias significativas se reflejaron como: \*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$ .

Como se ve en la Fig. 34a dicha expresión estaba muy reducida en las ratas subnutridas hacia la mitad de la lactancia (10 días) y en la etapa adulta. En coherencia con ello, la concentración hipotalámica de este neuropéptido (Fig. 34b) en los animales restringidos fue aproximadamente la mitad de lo observado en las ratas controles adultas.

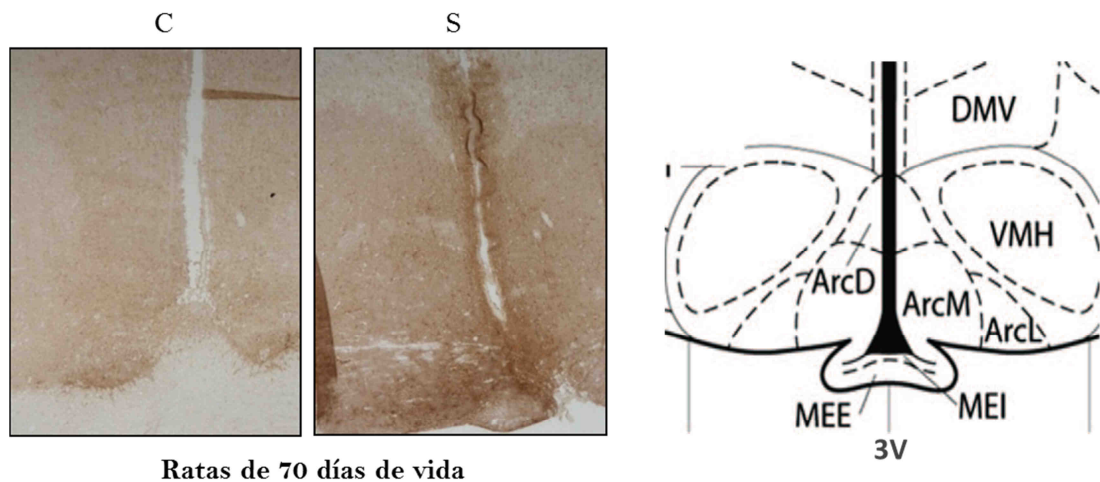
### 3.10.2.- Expresión y contenido de NPY

Como se ve en la Fig. 35, la subnutrición durante la lactancia no modificó la tasa de expresión de NPY. Sin embargo, esa condición restrictiva indujo un fuerte incremento en las ratas adultas: durante esa etapa, esos animales presentaron una expresión de este neuropéptido casi 4 veces superior a la de sus controles.



**Fig. 35.** Expresión de NPY en el hipotálamo de ratas controles y subnutridas de diferentes edades. Las barras (negras, controles; blancas, subnutridas) corresponden a las medias  $\pm$  SEM de 6-8 determinaciones independientes. La diferencia significativa se expresó como: \*\*\* $p < 0,001$ .

Para comprobar si esta elevada expresión se correspondía con un aumento real del neuropéptido, efectuamos un estudio inmunohistoquímico (sección 9 de Materiales y Métodos).



Ratas de 70 días de vida

Fig. 36. Microfotografías representativas de la tinción inmunohistoquímica de NPY, en secciones coronales del hipotálamo de ratas controles (C) y subnutridas (S) de 70 días de vida. Se corresponden con un aumento del microscopio de 10x. En el diagrama de la derecha se representan esquemáticamente las distintas regiones del hipotálamo de rata en sección coronal (Adaptado de: Paxinos & Watson, The Rat Brain Atlas, 1997). Las abreviaturas son: 3V, tercer ventrículo cerebral; MEI, eminencia media, capa interna; MEE, eminencia media, capa externa; Arc, núcleo arcuato; ArcD, parte dorsal; ArcL, parte lateral; ArcM, parte media; DMV, núcleo dorsomedial; VMH, núcleo ventromedial.

En la Fig. 36 se observa la presencia de pequeños grupos de neuronas positivas para NPY, distribuidas por varias regiones hipotalámicas. Estas regiones se indican en un diagrama adjunto. Como se ve, las neuronas se tiñeron más intensamente en las ratas subnutridas de 70 días de vida que en sus controles.

### 3.10.3.- Sensibilidad hipotalámica a la insulina

Estos resultados se llevaron a cabo en las condiciones descritas en la sección 2.2 de Materiales y Métodos.

#### A) Vía de la PI3 kinasa

Para evaluar el efecto de la subnutrición sobre la sensibilidad del hipotálamo a esta hormona anorexigénica se analizó, en las ratas adultas de 70 días, el contenido de las principales proteínas implicadas en su vía de señales metabólica, así como el grado de fosforilación de algunas de ellas tras la administración de una dosis de insulina por vía intracerebroventricular.

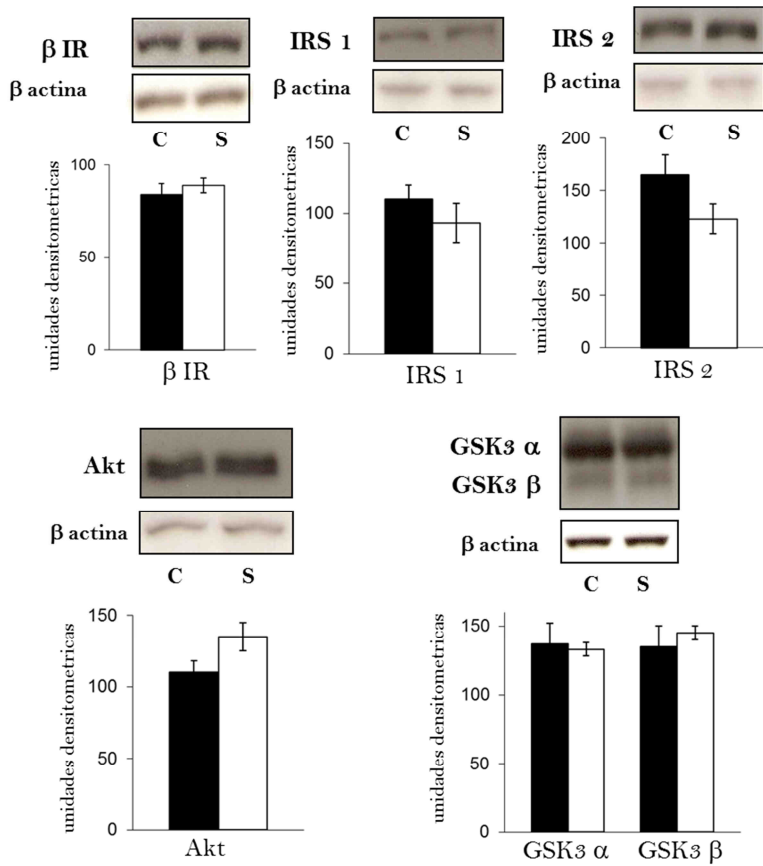


Fig. 37. Contenido de receptor de insulina ( $\beta$ IR), IRS-1/2, Akt y GSK3 $\alpha/\beta$  en el hipotálamo de ratas de 70 días, controles (C) y subnutridas (S). Se presentan autorradiografías representativas. Las barras (negras, controles; blancas, subnutridas) corresponden a las medias  $\pm$  SEM de 6-8 determinaciones independientes.

Como se ve en la Fig. 37, las cantidades de receptor, IRS-1/2, Akt y GSK3 $\alpha/\beta$  fueron similares en las ratas subnutridas y en sus controles. Un resultado destacable fue que la restricción nutricional provocó una disminución notable de la proteína PTP1B (fosfatasa que regula a la baja la activación del receptor y los IRS-1/2) como se ve en la Fig. 38.

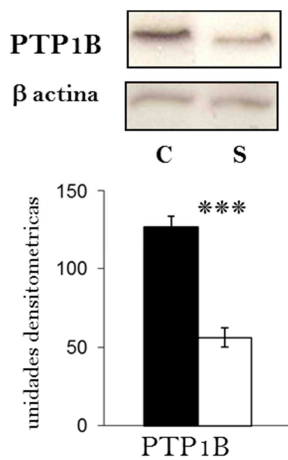


Fig. 38. PTP1B en el hipotálamo de ratas controles (C) y subnutridas (S) de 70 días de vida. Se muestra un autorradiograma representativo. Las barras (negras, controles; blancas, subnutridas) corresponden a las medias  $\pm$  SEM de 6-8 determinaciones independientes. La diferencia significativa se expresó como: \*\*\* $p < 0,001$ .

Como era previsible, la administración central de insulina aumentó la fosforilación del receptor de esta hormona en ambas poblaciones de ratas; sin embargo, el incremento fue superior en los animales subnutridos (Fig. 39).

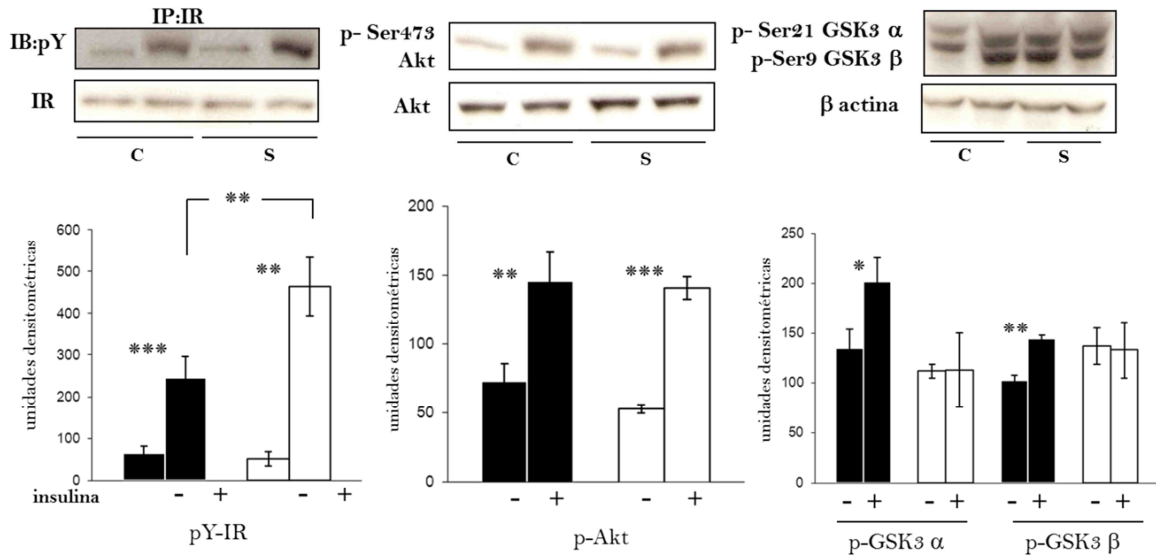


Fig. 39. Efecto de la insulina intra-cerebroventricular sobre la fosforilación del receptor de la hormona, Akt y GSK3 $\alpha/\beta$  en el hipotálamo de ratas de 70 días controles (C) y subnutridas (S). Se muestran autorradiogramas representativos y las barras (negras, controles; blancas, subnutridas) corresponden a las medias  $\pm$  SEM de 6-8 determinaciones independientes. Las diferencias significativas se expresaron como: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

El aumento de la fosforilación de Akt se produjo con una intensidad similar en las ratas controles y subnutridas. No obstante, en estas últimas la insulina no indujo un aumento de la fosforilación de GSK3 $\alpha/\beta$ , a diferencia de lo que ocurrió en las controles. Además, se evaluó el efecto de la subnutrición sobre el contenido basal en el hipotálamo y la activación por insulina de dos proteínas que también están situadas a continuación de la Akt y que poseen actividad serín-treonín kinásica; ambas se encuentran implicadas en la acción de esta hormona sobre diversas funciones, principalmente: síntesis proteica, crecimiento y supervivencia; se trata de las proteínas mTOR y P70S6K. Los resultados se muestran en la Fig. 40a.

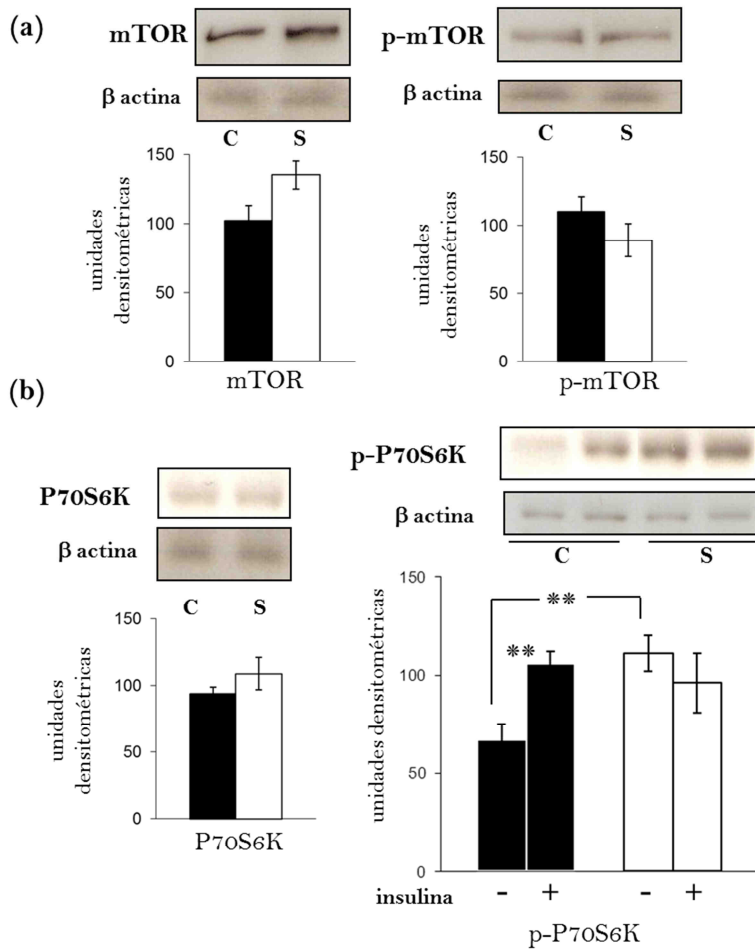


Fig. 40. (a) Contenidos hipotalámicos de mTOR y p-mTOR en ratas de 70 días controles (C) y subnutridas (S). (b) P70S6K en el hipotálamo de ratas controles (C) y subnutridas (S) de 70 días, así como esta proteína fosforilada antes y después de la administración central de insulina en dichos animales. Se muestran autorradiogramas representativos y las barras (negras, controles; blancas, subnutridas) corresponden a las medias  $\pm$  SEM de 6-8 determinaciones independientes. Las diferencias significativas se expresaron como: \*\* $p < 0,01$ .

La restricción nutricional no modificó el contenido hipotalámico de mTOR. Además, en ninguna de las dos poblaciones de ratas se detectaron cambios en su grado de fosforilación basal. Tampoco se observaron efectos de la subnutrición sobre el contenido hipotalámico de P70S6K (Fig. 40b). En este caso, la administración de insulina aumentó el grado de fosforilación de la proteína en las ratas controles, pero esta respuesta no se produjo en las subnutridas, cuya cantidad basal de fosfo-P70S6K se encontraba significativamente por encima del nivel característico de los animales control.

### B) Vía de las MAPKs

Además de la vía que conduce principalmente a efectos metabólicos, la insulina impulsa una cascada alternativa de señales que produce otro tipo de efectos, relacionados con el crecimiento y diferenciación. Se trata de la vía de las MAP kinasas (que también es inducida por otros receptores tirosín-kinásicos). Esta ruta se estimula mediante una serie de activaciones secuenciales que conducen a la fosforilación de tres tipos de kinasas, cuyas dianas finales son factores de transcripción. Dichas kinasas son: JNK, ERK y p38.

Hemos estudiado el efecto de la subnutrición sobre la cantidad de estas proteínas presentes en el hipotálamo y, además, en dos de ellas hemos evaluado la fosforilación inducida por la administración central de insulina.

(a)

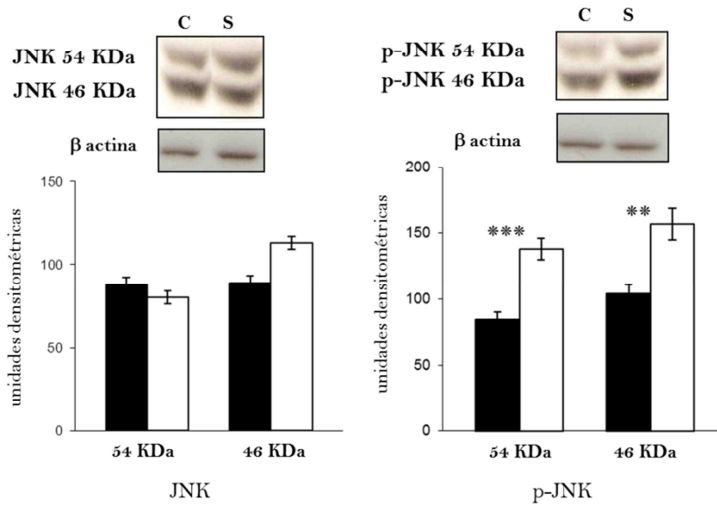


Fig. 41. (a) Contenido hipotalámico de JNK y p-JNK en ratas controlas (C) y subnutridas (S) de 70 días de vida. Las diferencias significativas se expresaron como: \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

(b)

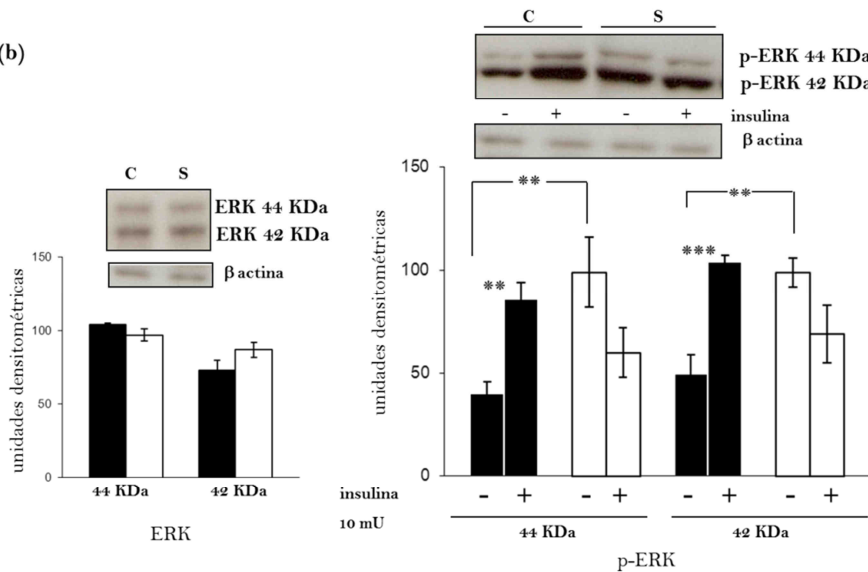


Fig. 41. (b) ERK y p-ERK en el hipotálamo de dichas ratas en situación basal y tras la administración central de insulina. Las diferencias significativas se expresaron como: \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

Como se ve en la Fig. 41a, las concentraciones basales de fosfo-JNK (en sus dos isoformas, de pesos moleculares 46 y 54 KDa) se encontraron aumentadas con la subnutrición, pero no fueron afectadas las formas totales. Esta condición tampoco influyó sobre el contenido de ERK (isoformas de 42 y 44 KDa), como se ve en la Fig. 41b.

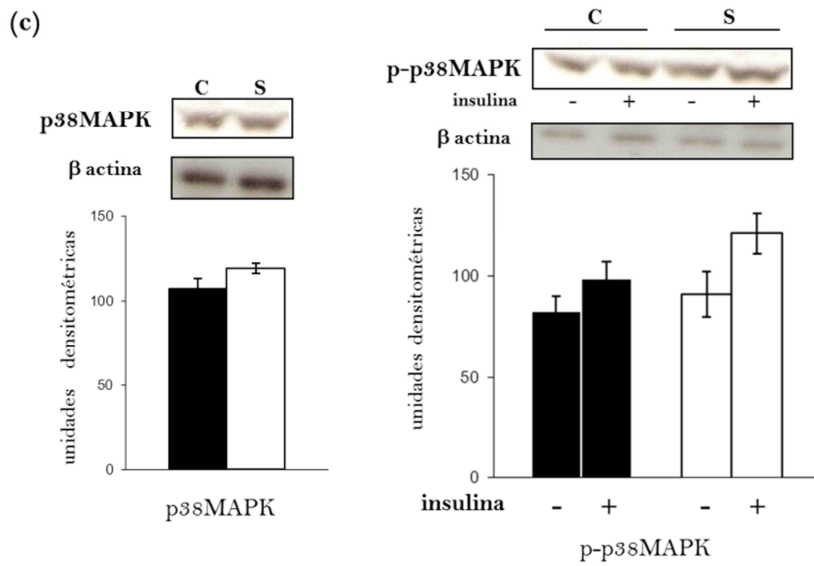


Fig. 41. (c) p38MAPK y fosfo-p38MAPK hipotalámicos en los animales indicados, en la situación basal y tras una dosis i.c.v. de insulina. Se muestran autorradiogramas representativos de cada análisis, así como barras (negras, controles; blancas, subnutridas) que corresponden a las medias  $\pm$  SEM de 6-8 determinaciones independientes.

La administración de insulina elevó marcadamente la fosforilación de esta proteína en las ratas controles, pero en las subnutridas el nivel basal de fosfo-ERK ya se encontraba por encima del que presentaban los animales controles y la hormona no suscitó un incremento adicional. Los resultados correspondientes a p38 se muestran en la Fig. 41c. La subnutrición no modificó el contenido de esta proteína y la inyección de insulina no indujo su fosforilación en ninguno de los dos grupos de ratas, en las condiciones en las que dicha fosforilación fue analizada.

#### 3.10.4.- Sensibilidad hipotalámica a la leptina

Se ha efectuado un estudio en ratas de 70 días acerca de los efectos de la subnutrición sobre la capacidad de respuesta del hipotálamo a la leptina, hormona fuertemente supresora del apetito. Como se ve en la Fig. 42, la restricción nutricional no alteró la concentración de tres proteínas claves en la vía de señales de dicha hormona: la especie OBR-b de su receptor, JAK2 y STAT3.

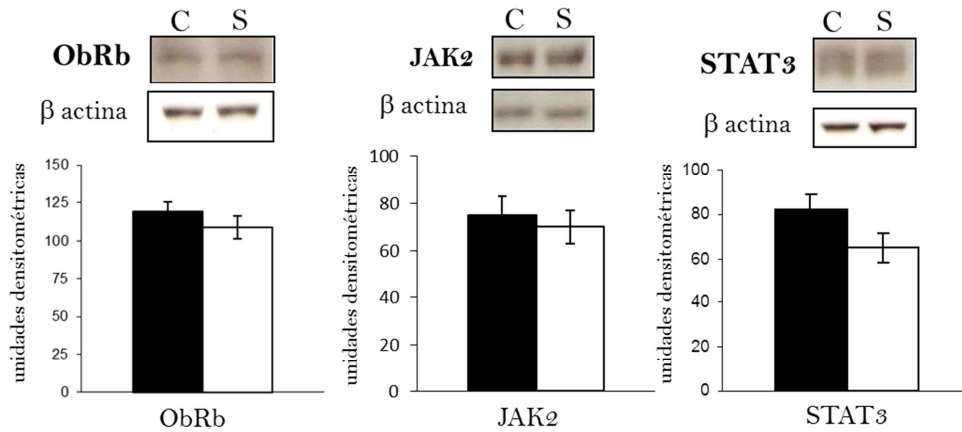


Fig. 42. Contenido hipotalámico de ObRb, JAK2 y STAT3 en ratas de 70 días, controles (C) y subnutridas (S). Se presentan autorradiogramas típicos y barras (negras, controles; blancas, subnutridas) correspondientes a las medias  $\pm$  SEM de 6-8 análisis independientes.

Como muestra la Fig. 43, al administrar leptina en el tercer ventrículo hipotalámico de las ratas controles se produjo un incremento de la fosforilación de las tres proteínas, en las posiciones analizadas.

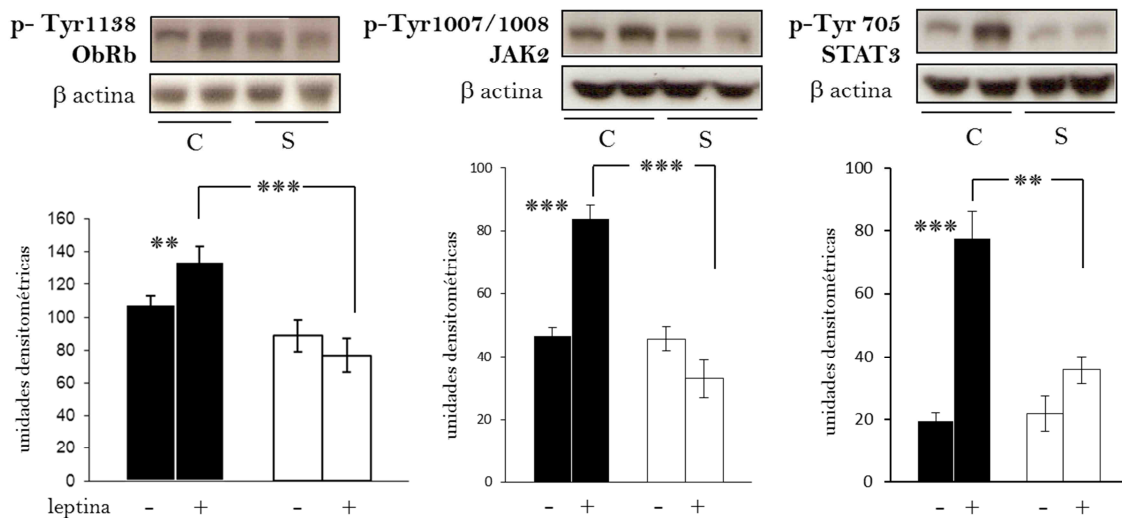


Fig. 43. Contenido de p-Tyr1138 ObRb, p-Tyr1007/1008 JAK2 y p-Tyr705 STAT3 en el hipotálamo de ratas controles (C) y subnutridas (S) de 70 días de vida. Se muestran autorradiogramas representativos y las barras (negras, controles; blancas, subnutridas) corresponden a las medias  $\pm$  SEM de 6-8 determinaciones independientes. Las diferencias significativas se expresaron como: \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

Sin embargo, ese mismo tratamiento en las ratas subnutridas no modificó el grado de fosforilación de dichas proteínas. Por otra parte, la restricción nutricional indujo un marcado incremento de la cantidad de SOCS3 en el hipotálamo, proteína que regula negativamente la vía de la leptina, como se ve en la Fig. 44.

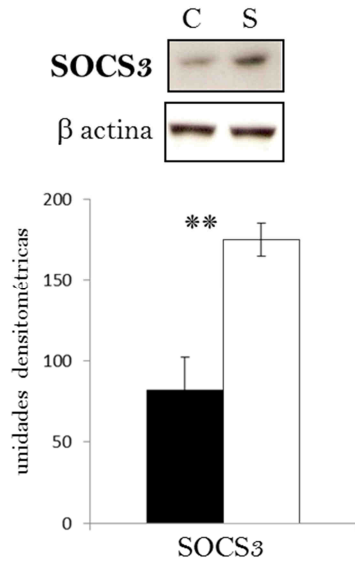


Fig. 44. SOCS3 hipotalámico en ratas de 70 días, controles (C) y subnutridas (S). Se muestra un autorradiograma representativo y en forma de barras (negras, controles; blancas, subnutridas) las medias  $\pm$  SEM de 6-8 análisis independientes. La diferencia significativa se expresó como: \*\*  $p < 0,01$ .

### 3.11.- Efectos de la subnutrición y realimentación sobre la sensibilidad global a la insulina

■ C9m    ▨ C9mCaf    □ S9m    ◻ S9mCaf

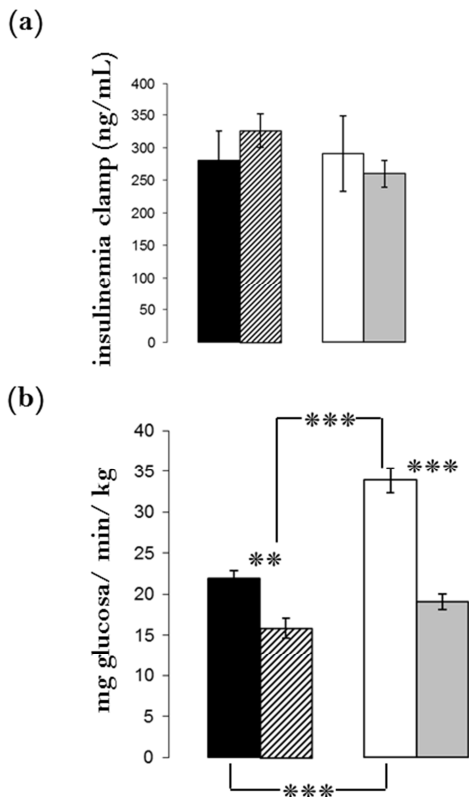
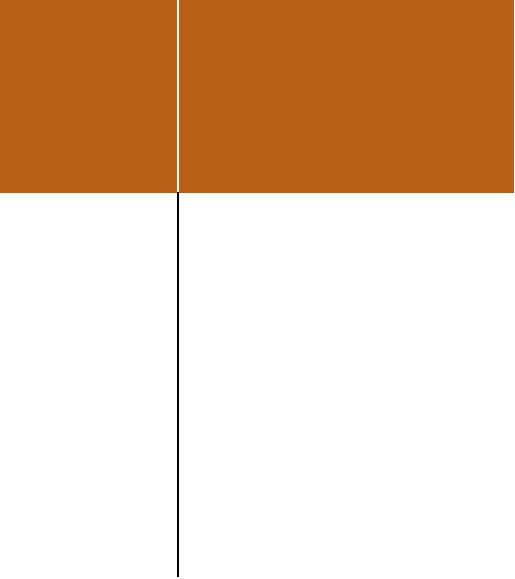


Fig. 45. Insulina plasmática (a) y tasa de infusión de glucosa (b) durante el desarrollo del clamp hiperinsulinémico-euglucémico en ratas de 9 meses, controles, subnutridas y realimentadas con la dieta de cafetería. Los valores medios  $\pm$  SEM correspondientes a 6-8 clamps independientes están representados como barras. Las diferencias significativas se expresaron como: \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

Este estudio se realizó en los cuatro grupos de ratas de 9 meses: controles, subnutridas y transferidas a la dieta de cafetería. La sensibilidad se analizó mediante el método de referencia, que es el clamp hiperinsulinémico-euglucémico (descrito en la sección 2.1 de Materiales y Métodos), aplicando una dosis máxima de insulina. Como se ve en la Fig. 45a, el nivel plasmático de hormona logrado en el clamp fue el mismo en los cuatro grupos de animales; además, dicho nivel se mantuvo estable durante el desarrollo de la prueba (resultado que no se muestra).

La tasa de infusión de glucosa necesaria para mantener la euglucemia fue superior en las ratas subnutridas que en las controles, indicando una mayor sensibilidad a la insulina. En los animales transferidos a la dieta hiperlipídica dicha tasa disminuyó significativamente, tanto en las controles como en las subnutridas. En estas últimas el descenso relativo fue mayor que en las controles, de modo que no hubo diferencias entre los grupos sometidos a la dieta de cafetería (Fig. 45b).





## **V. DISCUSIÓN**



## V. DISCUSIÓN

### 1.- Efecto de la subnutrición sobre el metabolismo hepático durante la lactancia

La leche, alimento exclusivo del lactante, se caracteriza por su riqueza relativa en lípidos y bajo contenido en glúcidos. Por ello, el metabolismo hepático durante esa etapa tiene dos objetivos principales: producir cuerpos cetónicos a partir de esos lípidos y glucosa a través de la gluconeogénesis. Ambos son sustratos cruciales para el desarrollo. La subnutrición disminuye la producción de leche. Si eso repercutiera sobre la disponibilidad de esos sustratos, podría tener consecuencias negativas sobre el desarrollo.

#### 1.1.- Glucemia y cetonemia en las ratas lactantes subnutridas

Para poder hacer frente a un crecimiento tan intenso como el que se produce en esta etapa crucial del desarrollo, las ratas lactantes de 10 días de vida necesitan una amplia disponibilidad de glucosa y cuerpos cetónicos (Cotter & col., 2011). La hipoglucemia que produjo la subnutrición coincidió con una concentración de cuerpos cetónicos más elevada en el torrente sanguíneo. Esta adaptación compensatoria también ha sido demostrada en otros modelos de restricción basados en dietas bajas en proteínas (Gamallo & col., 1989). Es una similitud notable en ambas condiciones nutricionales restrictivas, independientemente del tipo de déficit aplicado (proteico o global). En un ayuno prolongado durante la etapa adulta también se eleva la cetonemia, lo que contribuye a que se mantenga el metabolismo energético cerebral. Sin embargo, durante etapas inmaduras del desarrollo, la coincidencia de un estado de hipoglucemia con hipercetonemia no tiene por qué ser, necesariamente, beneficiosa. De hecho, hay estudios que demuestran que un aumento de 3-hidroxiacetil-CoA en el plasma de ratas lactantes sometidas a un coma hipoglucémico determina un peor pronóstico para la recuperación, en comparación con una situación en la que se mantenga normal el nivel de ese metabolito (Schuz & col., 2011). Quizá ello se relaciona con el hecho de que la cetosis altera el transporte de aminoácidos a través de la barrera hematoencefálica (Yudkoff & col., 2001). La glucosa y los cuerpos cetónicos son sustratos energéticos para el cerebro

pero, además, ejercen otras funciones, algunas de ellas complementarias. La glucosa proporciona los precursores necesarios para la síntesis de neurotransmisores y se metaboliza en el ciclo de las pentosas fosfato. Los cuerpos cetónicos, por su parte, generan acetil-CoA, utilizado como precursor fundamental para la síntesis de lípidos y aminoácidos (Morris, 2005). Por lo tanto, todos los cambios que se produzcan tanto en la disponibilidad de glucosa como en la de cuerpos cetónicos, durante esta etapa crucial de crecimiento cerebral, pueden tener consecuencias sobre todas estas vías alterando su intensidad.

Como se discutirá después con más detalle, la subnutrición indujo el aumento de una isoforma específica de transportador de monocarboxilatos en la corteza cerebral, lo que sugiere una intensificación de la captación cortical de cuerpos cetónicos. Todas estas alteraciones podrían tener repercusiones a corto y/o medio plazo sobre el metabolismo del cerebro en pleno desarrollo, pudiendo ser la causa de algunas anomalías ulteriores.

### **1.2.- Contenido hepático de glucógeno**

Como se ha comentado en la sección anterior, la peculiar composición de la leche determina que el metabolismo del lactante presente algunas características diferentes a las que son propias del animal adulto. Un hecho crucial durante la lactancia es el intenso crecimiento que experimenta el cerebro (“crecimiento acelerado”); éste se basa en el uso exclusivo de glucosa y cuerpos cetónicos, ambos de procedencia esencialmente hepática. La concentración de estos sustratos en la sangre depende fundamentalmente de las acciones de dos hormonas: insulina y glucagón. Por eso, los tejidos del lactante experimentan adaptaciones específicas en su capacidad de respuesta a estas hormonas. Así, el hígado y los restantes tejidos periféricos presentan cierto grado de resistencia a la insulina; en el caso de los tejidos periféricos, ello permite una menor utilización de glucosa y el consecuente aumento de su disponibilidad para el cerebro. Esta situación endocrina es muy adecuada para el lactante, pero nuestros resultados demuestran que experimenta alteraciones importantes cuando se establece un cuadro de subnutrición. Resultados previos de varios trabajos, obtenidos en ratas y otras especies, ya habían demostrado que diversos tipos de restricción nutricional aumentan la sensibilidad global y, lógicamente, tisular a la insulina: así se ha visto en músculo esquelético, cardíaco y tejido adiposo (Gosby & col., 2010; Dean & Cartee, 2000; Ozanne & col., 1997; Escrivá & col., 1992). Ahora bien: se trata de resultados referidos a animales adultos; las consecuencias de la subnutrición al respecto durante las etapas de crecimiento y

desarrollo no se habían estudiado. De ahí nuestro interés en investigar el impacto de la subnutrición sobre el hígado hacia la mitad de la fase lactante.

Como muestran nuestros datos, la subnutrición condujo a un marcado aumento del glucógeno acumulado en el hígado de las ratas lactantes, un hecho coherente con la hipoglucemia de estos animales porque indica una importante reducción de la capacidad hepática para exportar glucosa a la sangre. Por otra parte, este resultado coincide con lo que han descrito otros autores en modelos de subnutrición materna hipoproteica, confirmando que esta respuesta es independiente del tipo de subnutrición (Gosby & col., 2003; Gamallo & col., 1989). El incremento del glucógeno está acompañado por otra serie de cambios. Así, la subnutrición ocasionó un aumento significativo de los dos principales transportadores de glucosa en el hígado, GLUT-1 y GLUT-2. La deficiencia de glucosa plasmática junto con el acúmulo del glucógeno sugiere que en la rata subnutrida ambos transportadores facilitan la captación hepática de glucosa, y no su salida desde este órgano. Es una situación muy diferente de la que es normal en esa etapa del desarrollo, en la cual el hígado debe actuar como un órgano exportador activo de glucosa, para compensar el relativo déficit de este sustrato en la leche. Los bajos contenidos de glucosa y lactato que presenta el hígado de las ratas subnutridas son representativos, sin duda, de la elevada tasa de conversión de esta hexosa en glucógeno, así como de una reducción de la vía glucolítica.

Por otra parte, el incremento en la cantidad de GS y el descenso en la de GP favorecerán claramente que el destino prioritario de la glucosa captada por el hígado de la rata subnutrida sea la síntesis de glucógeno. Es bien sabido que la insulina actúa aumentando el nivel de GS y reduciendo el de GP (Syed & Khandelwal, 2000; Fujita & col., 1996). Considerando el hecho de que las ratas subnutridas son fuertemente hipoinsulinémicas, los cambios en la expresión de estas proteínas enzimáticas sugieren que la insulino-sensibilidad hepática de estos animales se encuentre incrementada, como se verá a continuación.

### **1.3.- Sensibilidad hepática a la insulina**

Aunque la subnutrición no modificó el contenido hepático de algunas moléculas claves de la vía de señales de la insulina (como el receptor, IRS-1, etc.), indujo aumentos significativos de IRS-2 y Akt, así como aumentos del grado de fosforilación basal de estas dos proteínas. En concordancia con ello, al estimular con una dosis de hormona a las ratas lactantes, la activación de la PI3K asociada al IRS-2 fue mayor en los animales

subnutridos. Lo mismo ocurrió con respecto a la fosforilación de la GSK3 $\beta$ , que es la isoforma mayoritaria en hígado. Por otra parte, en las ratas subnutridas la cantidad basal de P70S6K fosforilada (que también puede ser incrementada por la acción insulínica) se encuentra por encima del valor control, a pesar de la hipoinsulinemia que experimentan estos animales restringidos. Todo este conjunto de alteraciones indica que en el hígado de las ratas subnutridas se establece una situación de hipersensibilidad a la insulina. Se trata de una alteración muy relevante, ya que -como se ha indicado antes- la condición hepática fisiológica durante la lactancia debe ser de insulino-resistencia, para que el hígado mantenga eficazmente una intensa gluconeogénesis. La mayor capacidad de respuesta a la insulina explica el aumento del glucógeno, así como la hipoglucemia característica de las ratas subnutridas.

Es notable el hecho de que el IRS-1 no se altere por la subnutrición, en contraste con el aumento que experimenta el IRS-2. Se había propuesto que el primero de ellos estaría implicado esencialmente en el metabolismo glucídico, mientras que el IRS-2 actuaría prioritariamente en el lipídico, refiriéndose a animales adultos (Taniguchi & col., 2005). Sin embargo, nuestros resultados indican un aumento concomitante de la glucogenosíntesis y del IRS-2, lo que sugiere que este intermediario de la acción insulínica también influye de manera importante en el metabolismo glucídico durante la etapa lactante.

### **1.4.- Sensibilidad hepática al glucagón**

Los niveles plasmáticos de glucagón se encontraron disminuidos en las ratas subnutridas, resultado que coincide con el descrito por otros autores que estudiaron las etapas fetal y lactante de ratas procedentes de madres restringidas (Álvarez & col., 1986). Como la disminución de esta hormona ocurrió en una proporción similar al descenso que experimentó la insulina, el cociente insulina/glucagón no resultó alterado. Por otra parte, la subnutrición redujo de manera considerable el contenido de receptores hepáticos de glucagón. Ozanne & col. publicaron un estudio en el que estos receptores también estaban disminuidos en ratas adultas procedentes de madres que estuvieron bajo una restricción proteica durante la gestación y la lactancia (Ozanne & col., 1996). En este trabajo hemos visto que algunas respuestas al glucagón estaban significativamente disminuidas en las lactantes restringidas, un resultado *in vivo* que no se había publicado anteriormente. Así, cuando las ratas fueron estimuladas con inyecciones

intraperitoneales de la hormona, el estímulo sobre la glucogenolisis fue débil y no se produjo el incremento esperado en la glucemia, a diferencia de lo que ocurrió en las ratas controles. Por todo este conjunto de datos, podemos concluir que la subnutrición precoz condujo a una alteración en la sensibilidad a dos hormonas cruciales en la homeostasis glucídica, promoviendo resistencia al glucagón junto con hipersensibilidad a la insulina.

### 1.5.- Cetogénesis hepática

La hipercetonemia establecida en las ratas lactantes subnutridas podría explicarse por una hipotética reducción en el uso de cuerpos cetónicos. Sin embargo, el hecho de que la concentración de estos productos encontrada en el hígado de dichos animales esté muy elevada parece apuntar, más bien, a una intensificación de la cetogénesis. La actividad de la acetoacetyl-CoA tiolasa, primer enzima que actúa en dicha vía, estaba incrementada por la subnutrición, lo que favorece la sugerencia de una elevada cetogénesis. Es interesante remarcar que el aumento de esta vía se produjo a pesar de que la subnutrición implica una reducción en el aporte de leche y, por lo tanto, una menor disponibilidad de ácidos grasos, que son los precursores cetogénicos. Ello conduce a proponer que entre los dos destinos metabólicos inmediatos de estos sustratos, oxidación/esterificación, esté fuertemente incrementado el primero, en detrimento del segundo. En la oxidación de los ácidos grasos representa un papel decisivo la carnitina aciltransferasa I. Esta enzima, ubicada en la membrana externa de la mitocondria, transfiere los restos de acil-CoA largos desde el citosol al interior de este orgánulo, como paso previo a su  $\beta$ -oxidación, lo que constituye la etapa limitante en el uso oxidativo de estos sustratos. Es bien sabido que la actividad de esta transferasa es inhibida por el malonil-CoA, cuyo principal precursor en el hígado, según los trabajos de McGarry & Foster (McGarry & Foster, 1980), es la glucosa procedente de la glucogenolisis. Como hemos discutido anteriormente, este último proceso se encuentra inhibido en las ratas subnutridas, de lo que cabe deducir que la concentración intracelular de malonil-CoA esté deprimida. Por lo tanto, el incremento del glucógeno en el hígado de estos animales debe ser una condición que facilite que el metabolismo de los ácidos grasos esté desviado hacia la cetogénesis.

La intensidad de la cetogénesis varía en función de la potencia de los efectos de la insulina y glucagón sobre el hígado. Ambas hormonas actúan recíprocamente: cuando los efectos de la insulina son relativamente menores que los del glucagón, esta vía se estimula. Por lo tanto, es muy destacable la observación de que la producción hepática de

cuerpos cetónicos en las ratas lactantes subnutridas esté incrementada y, simultáneamente, el hígado experimente una hipersensibilidad a la insulina acompañada de resistencia al glucagón. Se trata de una situación que, según creemos, nunca se había descrito previamente. Este cuadro demuestra que durante la etapa lactante una sensibilidad elevada a la insulina no inhibe necesariamente la cetogénesis. Y, por otra parte, sugiere que el incremento de la cetogénesis asociado a la subnutrición no deriva de un efecto estimulante del glucagón, como es la condición fisiológica habitual, sino de otros factores, posibilidad previamente considerada por otros autores (Laffel, 1999). Entre esos factores podrían tenerse en cuenta, hipotéticamente, las catecolaminas, puesto que son activadoras de la lipólisis; sin embargo, se sabe que éstas no ejercen efectos cetogénicos directos en el hígado (Beylot, 1996). Por el contrario, los glucocorticoides sí que pueden inducir esos efectos (Cagdas & col., 2008). En este contexto, se sabe que las ratas descendientes de madres sometidas a dieta hipoproteica presentan una expresión incrementada de los receptores hepáticos de esas hormonas esteroídicas, tanto durante la lactancia como en la vida adulta (Bertram & col., 2001). También se han publicado resultados *in vitro* que van en esa dirección: se ha visto que en hepatocitos en cultivo, los glucocorticoides y la insulina actúan sinérgicamente para incrementar la síntesis de cuerpos cetónicos y la de glucógeno, situación muy similar a la que hemos observado en este trabajo en las ratas lactantes subnutridas. Por lo tanto, es posible que los glucocorticoides desempeñen un papel crucial en el desarrollo de la hipercetonemia asociada a la subnutrición.

Es interesante subrayar el hecho de que en el hígado de estos animales también parece elevarse la capacidad de exportación de los cuerpos cetónicos, dado el aumento que experimenta el transportador MCT1. La regulación de la síntesis de esta proteína no se conoce muy bien; sin embargo, se sabe que con el ayuno, situación comparable en cierto modo a la que experimentan las ratas subnutridas, esa síntesis es estimulada por la variedad  $\alpha$  de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (König & col., 2008).

## 2.- Efecto de la subnutrición sobre el córtex durante la lactancia

La nutrición influye poderosamente sobre el desarrollo y, por lo tanto, sobre el peso corporal y de cada órgano en particular. Como cabía esperar, las ratas lactantes subnutridas presentaron pesos de cuerpo y cerebro por debajo de los valores controles; sin embargo, la relación entre ambos (cerebro/cuerpo) fue significativamente más alta en las subnutridas. Se trata de una consecuencia de la subnutrición bien conocida, publicada repetidas veces. Este resultado suele interpretarse admitiendo que, bajo una condición restrictiva, el cerebro experimenta un menor retraso de su crecimiento que el resto del cuerpo; ello constituiría una especie de adaptación para proteger ese órgano y evitar daños más severos, a expensas del desarrollo de otros tejidos (*brain sparing*) (Laus & col., 2011; Peeling & Smart, 1994). Por otra parte, sin embargo, numerosos resultados obtenidos durante los últimos años en investigaciones efectuadas tanto en animales como en seres humanos demuestran que algunas circunstancias perinatales pueden desempeñar un papel clave en el desarrollo cognitivo, siendo el estado nutricional una de las más decisivas al respecto (Monk & col, 2013).

Desde hace años existe una corriente de opinión que sugiere que la relación ponderal cerebro/cuerpo es un parámetro vinculado directamente a la capacidad cognitiva, tanto en el ser humano como en otros animales. Pero se trata de una opinión cuestionable porque, desde luego, dicha relación no es un indicador válido para comparar capacidades cognitivas entre distintas especies de vertebrados. En cuanto al ser humano, lo que realmente parece deducirse de una relación cerebro/cuerpo elevada durante la niñez es que ese niño está experimentando una situación de subnutrición, de modo similar a lo que es cierto para la relación ponderal cerebro/hígado, como se ha demostrado recientemente (Marton & col, 2013). Lo cierto es que la subnutrición perinatal está asociada a logros intelectuales deficientes (de Rooij & col, 2010) e incluso a patologías mentales (Hulshoff & col, 2000), como se ha comentado en la sección 2 de la Introducción. Ello descarta una interpretación exclusivamente positiva del incremento en la relación cerebro/cuerpo, al menos cuando ese incremento está asociado a una restricción nutricional. Por el contrario, se puede pensar que el aumento relativo del peso cerebral durante la lactancia podría ser causa de algunas anomalías funcionales ulteriores. En apoyo de esta sugerencia, en este trabajo hemos visto que en nuestro modelo experimental la restricción nutricional materna induce ese aumento ponderal

relativo pero también una serie de anomalías en el córtex de las ratas lactantes, las cuales comentamos a continuación.

### **2.1.- Glucógeno y transportadores de glucosa en el córtex**

Dado que en el cerebro no es activa la gluconeogénesis y el contenido de glucógeno es escaso, la mayor parte de la glucosa usada por este órgano procede de la sangre. Es captada por dos variedades de transportadores pasivos: GLUT-1 y GLUT-3. El GLUT1 se expresa exclusivamente en las neuronas. El GLUT-1 está presente bajo dos isoformas con un grado de glucosilación diferente: la menor, GLUT-1 (45 KDa), se encuentra en los astrocitos y la mayor GLUT-1 (55 KDa), es la propia de las células endoteliales de los microvasos que forman parte de la barrera hematoencefálica (Jope & col., 2007). La subnutrición indujo un incremento específico de la cantidad de GLUT-1 astrocítico. Simultáneamente, ocasionó un aumento de la concentración de glucógeno cortical. Mediante un análisis histológico hemos demostrado que la carga extra de dicho glucógeno se encontraba depositada en los astrocitos, sin implicar a las neuronas. Los astrocitos, que constituyen la forma predominante de glías en el cerebro de los mamíferos (Brown & Ransom, 2007), son las células que almacenan la pequeña cantidad de glucógeno depositado en el SNC. Sin embargo, todavía no está completamente establecida la función de este glúcido en el tejido nervioso; por ello no podemos deducir cuál es la relevancia, ni las consecuencias, de este incremento asociado a la subnutrición perinatal. De hecho, es una observación que se describe en este trabajo por vez primera. Sin embargo, existe la posibilidad de que el aumento del glucógeno se relacione con la alteración de alguna actividad neurotransmisora, como discutiremos a continuación.

La elevada cantidad de glucógeno depositada en los astrocitos podría deberse a un aumento de su síntesis, a una deficiencia de su degradación o a ambas alteraciones. Como se verá más adelante, nuestros resultados sugieren la posibilidad de que la actividad de la glucógeno sintasa se encuentre estimulada en el córtex de las ratas lactantes subnutridas, lo que indicaría que la concentración del glucógeno se haya incrementado porque aumenta su síntesis; pero esos resultados no descartan que los animales restringidos también experimenten una reducción de la glucogenolisis en la corteza cerebral. Una consecuencia de ello sería una menor producción de piruvato y lactato procedentes del glucógeno. Ambos metabolitos son transferidos desde los astrocitos hasta las neuronas próximas. Estas últimas carecen de reservas energéticas

(Dringen & col., 1993) y por lo tanto un déficit en el trasvase de estos sustratos podría repercutir negativamente sobre ellas. La reducción de la glucogenolisis también tendría consecuencias negativas para los propios astrocitos. Se ha demostrado que la obtención de energía por parte de estas células gliales es muy dependiente de esa vía y la subsecuente glucolisis (Hertz & col., 2007). Por ello, una depresión en la intensidad de la glucogenolisis podría repercutir sobre las funciones gliales. Una de estas funciones es crucial: la síntesis del neurotransmisor glutamato (Gibbs & col., 2007) y su captación por la neuronas (Sickmann & col., 2009). De ahí la posibilidad de que ese incremento irregular del glucógeno implique un descenso de la actividad glutamatérgica. Es importante destacar que dicha actividad está relacionada con los procesos cognitivos (Rotta & col., 2003). Por otra parte, se sabe que el glucógeno cerebral está aumentado en diferentes condiciones patológicas en las cuales la actividad neuronal está reducida, como en los cuadros de isquemia y en los traumatismos cerebrales; el glucógeno también está elevado bajo situación de anestesia (Phelps, 1972; Kajihara & col., 2001). Todo ello sugiere que el aumento del glucógeno cortical astrocítico en las ratas subnutridas podría conllevar la reducción de algunas funciones neuronales. En este sentido, parecen sugestivos los trabajos de Gibbs & col. (2006) demostrando que una inhibición de la glucogenolisis en los astrocitos de pollos neonatales disminuye su capacidad para desarrollar funciones que impliquen a la memoria.

## 2.2.- Capacidad de uso y transporte de los cuerpos cetónicos en el córtex

Además de la glucosa, los cuerpos cetónicos son los únicos sustratos capaces de ser utilizados por el SNC durante las etapas de crecimiento y desarrollo. Como se ha visto anteriormente (sección 1.1. de la Discusión), la cetonemia estaba elevada en las ratas subnutridas, aunque las actividades enzimáticas implicadas en el uso de los cuerpos cetónicos no fueron afectadas en el córtex por la subnutrición. Ahora bien: se sabe que otro factor decisivo para la utilización de estos sustratos es su disponibilidad, la cual depende de la eficacia de su transporte al interior celular. Para captar los cuerpos cetónicos (junto con otros monocarboxilatos, como piruvato y lactato) las células nerviosas expresan tres isoformas de transportadores, denominados MCTs (*Monocarboxylate Transporters*). Las células endoteliales de la barrera hematoencefálica contienen exclusivamente MCT1, mientras que las neuronas coexpresan MCT1 y MCT2 y las glías MCT1 y MCT4 (Merezhinskaya & Fishbein, 2009). El contenido cortical de MCT1 aumentó de modo notable en las ratas subnutridas. Se ha visto que la

expresión de este transportador también se incrementa en las células endoteliales de ratas sometidas a dietas cetogénicas (Leino & col., 2001), resultado comparable al que hemos obtenido aquí, ya que las ratas subnutridas son hipercetonémicas. La presencia de una cantidad incrementada de transportador probablemente facilite una mayor captación de cuerpos cetónicos por parte de los astrocitos que rodean los capilares de la barrera hematoencefálica. En cuanto al contenido del MCT2 que -como se ha indicado- es una isoforma exclusivamente neuronal (Bergersen, 2007), experimentó una fuerte reducción con la subnutrición. Este cambio podría suponer una limitación de la entrada de cuerpos cetónicos a las neuronas. Quizá ello impida una sobrecarga de estos compuestos en el citoplasma, ya que -por su carácter ácido- podrían inducir una bajada del pH citosólico. El MCT2 también está presente en las sinapsis y esta misma proteína de transporte experimenta tránsito intracelular (Bergersen, 2007). Se ha visto que durante los procesos de plasticidad sináptica se producen cambios en su tasa de expresión (Robinet & Pellerin, 2010). Por eso, las modificaciones de los MCTs en el córtex como consecuencia de la subnutrición -observadas por vez primera en este trabajo- permiten plantear la posibilidad de que con esa condición coexistan alteraciones en las conexiones sinápticas.

Los MCTs también transportan lactato. En consecuencia, los cambios de estas proteínas observados con la subnutrición podrían influir sobre la transferencia de este sustrato. Se trata de una cuestión importante porque se sabe que el bloqueo de dicha transferencia tiene efectos perniciosos *in vivo* (Adle-Biassette & col., 2007). A este respecto hay que subrayar el hecho de que el MCT2, que es la isoforma que presenta más afinidad por el lactato (Merezhinska & Fishbein, 2009), se encuentra marcadamente disminuida en las ratas subnutridas.

Los cuerpos cetónicos intervienen en el control hipotalámico de la ingesta que llevan a cabo la insulina y leptina (Laeger & col., 2010). Así, se sabe que en ratas que desarrollan hipercetonemia y presentan elevadas tasas de transferencia de cuerpos cetónicos a través de la barrera hematoencefálica, la inhibición del apetito que deberían provocar estas hormonas se encuentra disminuida (Fisler & col., 1989). En base a ello, cabe sugerir la posibilidad de que los cambios de MCTs observados en el córtex de las ratas subnutridas inmaduras, en conjunción con su situación de hipercetonemia, incidan sobre los mecanismos de regulación del apetito hasta el punto de conferir a estos animales restringidos un riesgo mayor de obesidad.

### 2.3.- Vía cortical de señales de la insulina

La subnutrición no alteró la cantidad de receptores de insulina, IRS-1/2 y Akt; tampoco afectó las proporciones de ERK y p38, aunque disminuyó la de JNK. El grado de fosforilación basal de IRS-1/2, Akt y ERK tampoco estuvo alterado en las ratas restringidas, aunque esa condición indujo una disminución de fosfo-JNK y fosfo-p38. Para comprobar si la subnutrición precoz tiene consecuencias sobre la capacidad de respuesta cortical a la insulina se administró una dosis intraperitoneal de esta hormona. El tratamiento indujo una fosforilación rápida del receptor que fue similar en los dos tipos de ratas -controles y subnutridas-, resultado demostrativo de que la insulina es capaz de acceder desde la periferia al cerebro de la rata lactante y de que esta capacidad no se altera con la subnutrición. Confirmando esta conclusión, cuando un grupo de ratas previamente ayunadas experimentó ese tratamiento se obtuvo la misma respuesta.

Sorprendentemente, a pesar de la activación del receptor, el grado de fosforilación de Akt y de las principales proteínas analizadas en la vía de señales no se incrementó en ninguna de las dos poblaciones de ratas al inyectar insulina, tanto si los animales se habían sometido a un ayuno previo como si no. Es un resultado que contrasta con el que se obtuvo en el hígado, órgano que se analizó como referencia; en ambos grupos de ratas la Akt hepática experimentó un marcado incremento de su fosforilación al inyectar insulina, tanto si habían mamado como si se encontraban en ayunas. Dado que, como hemos señalado antes, el receptor de la hormona sí que experimentó fosforilación, estos resultados pueden interpretarse en el sentido siguiente: las principales proteínas transductoras de la señal insulínica ya se encuentran basalmente activadas en el córtex inmaduro, de manera que la hormona no induce incrementos añadidos de su grado de fosforilación. Al menos pareció ocurrir así en un plazo de tiempo corto tras su administración, que es la condición aquí analizada. No conocemos otros trabajos en los que se haya estudiado el efecto de la insulina *in vivo* sobre la vía de señales en el córtex cerebral durante la etapa de desarrollo. Clodfelder-Miller y col. (2005) observaron que la hormona induce un aumento rápido y transitorio de la fosfo-Akt en el córtex de ratones sometidos a ayuno, pero esos animales eran adultos. La discrepancia entre el resultado de estos autores y los nuestros podría deberse al distinto grado de desarrollo de los animales; pero, en rigor, no puede descartarse que existan diferencias entre ambas especies.

## 2.4.- Subnutrición y GSK3 cortical

Se ha demostrado que la insulina es capaz de inducir la síntesis de glucógeno tanto en el cerebro adulto (Choi & col., 2003) como en astrocitos de ratas neonatales (Dringen & col., 1993). Además, existe una correlación directa entre el contenido de glucógeno en estas células y la actividad del enzima limitante de su síntesis, la glucógeno sintasa (Allaman & col., 2004). Esta última se inactiva por fosforilación, proceso que puede ser catalizado por GSK3 y AMPK (Wojtaszewski & col., 2002; Cammisotto & col., 2008). Dado que el glucógeno depositado en los astrocitos de las ratas subnutridas estaba incrementado, buscamos un posible mecanismo de este cambio analizando el contenido cortical de estas kinasas y su grado de fosforilación. Con respecto a la GSK3 comprobamos que los niveles de la isoforma  $\beta$  eran superiores a los de la  $\alpha$ , como ya se había descrito para ese tejido. Además, observamos que la subnutrición no alteró el contenido total de esta proteína. Sin embargo, esa condición aumentó la proporción de su forma fosforilada en serina, un cambio que determina su inactivación. Paralelamente, la fosfo-AMPK se encontró disminuida en las ratas subnutridas. En este caso, la forma fosforilada de la kinasa es la especie activa y para corroborarlo analizamos el grado de fosforilación de la acetil CoA carboxilasa, su proteína sustrato. Observamos que, efectivamente, estaba reducido en las ratas subnutridas. Un hecho destacable es que en varios trabajos se ha comprobado que durante los procesos metodológicos necesarios para el aislamiento y análisis de estas dos kinasas, GSK3 y AMPK, el grado de fosforilación no se modifica, lo que indica que nuestros datos se corresponden con lo que realmente está presente *in vivo*.

En conjunto, todos estos resultados indican que la subnutrición indujo una reducción de las actividades de GSK3 y AMPK, ambas capaces de fosforilar a la glucógeno sintasa y de ese modo disminuir su actividad. En consecuencia, una menor regulación a la baja de esta sintasa inducirá un aumento de la síntesis de glucógeno, lo que concuerda con el incremento de su concentración observado en los astrocitos del córtex de las ratas subnutridas.

La principal kinasa que fosforila GSK3 para inhibir su actividad es la Akt; sin embargo, como ya hemos señalado, nosotros no encontramos diferencias en la fosforilación de ésta al comparar las dos poblaciones de ratas lactantes, controles y subnutridas. Esto nos lleva a proponer que el incremento de la fosfo-GSK3 en estas

últimas no esté relacionado con la Akt. Una posibilidad alternativa es que dicho incremento derive de cambios en otras kinasas que no se han estudiado en este trabajo; se sabe que algunas de ellas, como la PKC y PKA pueden modificar el grado de fosforilación de GSK3. Por otra parte, algunas fosfatasa también pueden actuar en este sentido (Jope & col., 2007). Nuestros resultados sugieren, por lo tanto, la posibilidad de que algunas de estas kinasas y fosfatasa resulten alteradas por la subnutrición.

También permiten especular con otra posible consecuencia de la subnutrición que, a pesar de su carácter hipotético, merece la pena comentar. La corteza cerebral está compuesta por una población celular muy heterogénea. Como se ha mencionado anteriormente, el glucógeno se localiza en los astrocitos. Por ello puede deducirse que el incremento en fosfo-GSK3 asociado a la subnutrición se esté produciendo en estas células gliales. Sin embargo, para analizar dicha kinasa se han utilizado lisados enteros del córtex, en donde están representadas todas las estirpes celulares de la corteza. Esto permite pensar en la posibilidad de que la regulación negativa de la actividad de GSK3 asociada a la subnutrición también pudiera estar ocurriendo en las neuronas. Se trata de una kinasa multifuncional, que cataliza la fosforilación de numerosas proteínas con muchos destinos y papeles en la célula (además de la enzima glucógeno sintasa). Así que su inhibición podría afectar a otros procesos de la corteza cerebral, órgano de especial vulnerabilidad por encontrarse en pleno desarrollo. De hecho, la desregulación de la actividad de GSK3 ha sido propuesta por diversos autores como un factor etiológico para varias enfermedades (Jope & col., 2007).

## **2.5.- Efecto de la subnutrición sobre el AMPK en el córtex**

La AMPK es una Ser/Thr kinasa que funciona como sensor del nivel energético celular. El principal determinante de su activación, que es alostérica y también por fosforilación, es la caída del nivel energético celular. Cuando ello ocurre, la AMPK regula negativamente las rutas anabólicas y se activan los procesos de producción de ATP. La AMPK se expresa intensamente durante el desarrollo del SNC (Culmsee & col., 2001). Se ha descubierto que esta kinasa es capaz de responder a los cambios energéticos en cultivos de neuronas (Kleman & col., 2008) y de astrocitos corticales (Mukherjee & col., 2008). Bajo condiciones de restricción nutricional, la AMPK se activa (Kim & col., 2004) y por esa razón quisimos estudiar si en la corteza cerebral de las ratas subnutridas se inducía algún cambio en esta kinasa. Comprobamos que se producía un descenso en el contenido de AMPK fosforilada, mientras que no se alteraban los niveles totales de la

proteína. Este resultado podría indicar que la restricción calórica no ocasionó una disminución del metabolismo energético de la corteza durante la etapa de desarrollo. Es decir: aunque la glucosa sérica es la principal fuente de energía que utiliza el cerebro y a pesar de que las ratas subnutridas son ligeramente hipoglucémicas, su metabolismo energético no parece encontrarse reducido. Quizá, dado que el descenso de la glucosa en sangre es cuantitativamente menor, su disponibilidad y metabolismo no lleguen a estar limitados. Incluso, el aumento del glucógeno cortical podría indicar que una fracción de esa glucosa es desviada hacia su síntesis. Por otra parte, la acumulación exagerada de este glúcido también podría ejercer un efecto inhibitorio sobre la AMPK cortical, explicando el descenso que se produce en su fosforilación, puesto que esta kinasa se inactiva cuando el glucógeno se liga a su subunidad  $\beta$  (Polekhina & col., 2003).

## 2.6.- MAP kinasas y proteínas apoptóticas

Las MAPKs son una familia de Ser/Thr kinasas que regulan muchos procesos asociados con el crecimiento celular. Están implicadas en la fosforilación de numerosos sustratos y regulan una amplia gama de acontecimientos durante el desarrollo del sistema nervioso: supervivencia, diferenciación, proliferación y apoptosis (Takeda & Ichijo 2002). Además, también intervienen en procesos de aprendizaje y memoria (Sweatt 2001). En este trabajo, como primera aproximación al estudio de los efectos de la subnutrición sobre esta familia de kinasas en el córtex hemos analizado el contenido y fosforilación de las tres principales: ERK, p38 y JNK. La subnutrición no causó ningún efecto sobre la expresión de ERK-1/2 ni sobre su nivel de fosforilación; sin embargo, esta condición nutricional indujo algunas modificaciones en las otras dos MAPKs. En concreto, JNK-1/2 y sus formas fosforiladas disminuyeron ligeramente y fosfo-p38MAPK se redujo de manera muy importante. Las formas activadas de JNK y de p38 actúan como mediadoras en la vía apoptótica neuronal. Por el contrario, si se encuentran inhibidas protegen a la células de la muerte por apoptosis, según se ha demostrado en algunas investigaciones realizadas *in vitro* (Yang & col., 2007; Xie & col., 2004). Por lo tanto, se planteó la posibilidad de que estas alteraciones de las MAPKs, en las cortezas cerebrales de los animales restringidos, pudieran repercutir sobre la muerte celular. Para abordar esta cuestión analizamos algunas proteínas relacionadas con la supervivencia y la apoptosis, como Bad, BclxL y Bax. Tanto Bad, una proteína que favorece la apoptosis, como Bcl-xL, un factor antiapoptótico, no cambiaron en la corteza cerebral de las lactantes restringidas en comparación con las controles. Se sabe que la interacción de las

formas no fosforiladas de Bad y de Bcl-xL, promueve la liberación del factor apoptótico Bax (a partir de BclxL) así como su translocación a la mitocondria y la activación de la cascada de las caspasas, con la consecuente estimulación de la apoptosis. Sin embargo, la fosforilación de Bad bloquea ese mecanismo y por ello dicha fosforilación es, realmente un acontecimiento promotor de la supervivencia. En nuestro caso, el contenido de Bad fosforilado en Ser 112 se encontró reducido con la subnutrición. Esta fosforilación específica, que va a decidir si la apoptosis se desencadena o no, está catalizada por ERK (Zhu & col., 2002). Sin embargo, esta MAPK no se encontraba alterada en las ratas restringidas, por lo que cabría sugerir, alternativamente, que la actividad de ciertas fosfatasas (García & col., 2003) estuviera modificada por la subnutrición y que ello causara la reducción de la fosforilación de Bad. Sin embargo, la subnutrición indujo simultáneamente una disminución de Bax. Se sabe que la apoptosis depende de un equilibrio entre factores pro- y anti-apoptóticos. Puesto que los cambios observados en el córtex de las ratas subnutridas inducen efectos opuestos sobre la apoptosis, es probable que, en definitiva, la cantidad de Bax susceptible de ingresar en la mitocondria no sea modificada por la restricción nutricional.

Para obtener información más directa sobre posibles cambios en la intensidad apoptótica en el córtex derivados de la subnutrición llevamos a cabo un análisis de la principal caspasa efectora de la apoptosis, la caspasa 3, así como de su forma activada, mediante Western Blot. Comprobamos que los niveles de la caspasa activada estaban marcadamente bajos en las ratas de 10 días; de hecho, fue necesario sobreexponer la película radiográfica para que la señal se evidenciara. Ello es indicativo de que los procesos de muerte celular programada dependientes de esta caspasa son casi inexistentes en esta etapa de la lactancia, caracterizada por un intenso crecimiento y desarrollo. Además, nuestros resultados señalaron que la subnutrición no influyó sobre los niveles de caspasa 3 ni de su forma fragmentada; dicho de otro modo: demostramos que esta restricción no induce cambios apreciables en la apoptosis cortical en el cerebro inmaduro. La fosfo-Akt, que es un factor crucial en la regulación de la muerte y supervivencia neuronal, no estaba alterada en las ratas subnutridas -como se ha visto más atrás- lo que corrobora esa afirmación. De todos modos, estos resultados no descartan la posibilidad de un efecto de la subnutrición sobre la apoptosis en algunas poblaciones celulares corticales específicas; se trataría de efectos cuantitativamente limitados, no apreciables al analizar los lisados preparados a partir de la corteza entera, que es la aproximación llevada a cabo en este trabajo. Por otra parte, no se puede

descartar que la subnutrición induzca pérdidas celulares por otros mecanismos, independientes de la apoptosis (Stefanis, 2005).

### **3.- Efecto de la realimentación con dieta hipercalórica en ratas adultas crónicamente subnutridas**

La hipótesis de la programación fetal (sección 1.2 de la Introducción) indica que algunas alteraciones establecidas en etapas de inmadurez y desarrollo pueden producir consecuencias patológicas a largo plazo. Entre esas alteraciones destaca especialmente la subnutrición perinatal, por su prevalencia. Es una condición que puede predisponer para algunos de los hechos patológicos que comprende el “síndrome metabólico” (Yajnik & Deshmukh, 2008; Barker, 2004). Desai & col. (2007) observaron que ratas descendientes de madres sometidas a subnutrición global durante parte de la gestación y toda la lactancia presentaban obesidad en la etapa adulta. Blondeau & col. (1999), aplicando un modelo experimental similar al de este trabajo, demostraron que la subnutrición disminuye la capacidad de las células  $\beta$  pancreáticas para adaptarse a situaciones que exigen una secreción mayor de insulina, como la gestación y el envejecimiento. Este tipo de resultados muestra que la subnutrición precoz tiene consecuencias a largo plazo, en línea con la hipótesis de la programación fetal. Entre esas consecuencias negativas, es destacable el incremento del riesgo de obesidad. Es probable que la subnutrición induzca cambios en los centros hipotalámicos implicados en el control de la ingesta y la saciedad, como han propuesto algunos autores (Plagemann & col., 2000a; Plagemann & col., 2000b).

#### **3.1.- Características de la fórmula de cafetería**

El modelo experimental basado en la realimentación con una dieta obesigénica fue desarrollado en este trabajo aplicando una fórmula de “cafetería” elaborada en nuestro propio laboratorio, cuya composición se detalla en la sección 1.2 de Materiales y Métodos. Las dietas de cafetería se utilizan con frecuencia en estudios experimentales en los que se pretende lograr una pauta de alimentación similar a la de los seres humanos. Suelen ser comidas palatables, densas en calorías por su elevado contenido graso, pobres en fibras y con efecto obesigénico. Para algunos autores, los roedores sometidos a las dietas de cafetería constituyen modelos más próximos a la realidad humana que los que

están basados en dietas hiperlipídicas comerciales, otra posibilidad también ampliamente utilizada (Sampey & col., 2011).

Las dietas inductoras de obesidad producen alteraciones diversas: hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, adiposidad blanca incrementada (Lalanza & col., 2014), acumulación de lípidos ectópicos y un ambiente inflamatorio con aumento de adipoquinas (rev. por Buettner & col., 2007). Estas dietas suelen contener un 40-60 % de sus calorías totales en la grasa. En nuestro caso, la proporción de calorías lipídicas proporcionadas por la fórmula de cafetería es inferior a lo que es habitual en ese tipo de dietas: alrededor del 25%. El objetivo de esta reducción era que el efecto obesigénico no fuera excesivamente intenso, para observar mejor la influencia que pudiera tener al respecto la condición previa de subnutrición. Por otra parte, este tratamiento dietario se prolongó solamente durante 6.5 meses, para que la duración fuera larga pero sin que llegaran a aparecer efectos ligados al envejecimiento.

### **3.2.- Efecto de la realimentación sobre la ingesta**

Las dietas de cafetería tienden a producir hiperfagia. Se admite que ello se debe a su carácter hiperlipídico, puesto que las grasas suprimen menos el apetito que los glúcidos, tanto durante la ingesta como en los intervalos entre comidas (Warwick & Weingarten, 1995); además, las dietas hipercalóricas inducen resistencia frente a los efectos saciantes de la colecistoquinina (Savastano & Covasa, 2005). A pesar de ello, hemos visto que las ratas controles transferidas a la dieta de cafetería redujeron su ingesta, en términos ponderales. Esta consecuencia la han descrito también otros autores (Estrany & col., 2011); de hecho, no es infrecuente que se produzcan reducciones similares cuando se administran mezclas hiperlipídicas (cuya composición, por otra parte, es muy heterogénea); en esos casos se deduce que la combinación de ingredientes resultó ser menos palatable. Probablemente, esto es lo que ocurrió con nuestra fórmula de cafetería: fue menos apetecible para las ratas que el pienso estándar, un resultado que no habíamos previsto. Sin embargo, un hecho notable fue que las ratas controles sometidas a esa dieta ajustaron de manera espontánea su ingesta en calorías, de modo que ésta se igualó a la ingesta de las ratas que estuvieron permanentemente sometidas al pienso comercial. En cambio, la ingesta calórica de comida de cafetería efectuada por las ratas previamente subnutridas fue muy superior a la de las controles, lo que indicaba que este grupo de animales experimentó hiperfagia; más adelante se describirán una serie de cambios hipotalámicos que pueden explicar ese comportamiento alimentario.

### 3.3.- Efecto de la realimentación sobre el peso y otros parámetros antropométricos

Las ratas controles transferidas a la fórmula de cafetería aumentaron de peso más que los animales que comían pienso; su índice de masa corporal y su diámetro abdominal también se incrementaron, superando significativamente los valores controles. Estos resultados demuestran el carácter obesigénico de esa dieta. No obstante, la ganancia ponderal no fue tan marcada como la que se describe en otros modelos experimentales en los que se utilizan dietas con una proporción de calorías lipídicas superior a la que aquí se ha aplicado (Martire & col., 2013). Ello es coherente con el carácter menos denso en calorías de nuestra fórmula de cafetería, según se ha indicado antes. Por lo tanto, en las ratas controles esta fórmula ejercía un efecto obesigénico moderado. No indujo cambios en la longitud corporal; las ratas cesan ese tipo de crecimiento a partir de los dos meses, aproximadamente (Thomas & col., 2000).

La transferencia a la dieta de cafetería de las ratas con antecedentes de subnutrición tuvo consecuencias marcadas sobre el peso: éste experimentó un incremento rápido durante una etapa inicial y, a continuación, progresó más lentamente. Al final, a pesar de que con respecto al peso de partida el incremento fue mayor que en las ratas controles, las subnutridas no lograron igualar el peso de esos animales. Aunque no podemos saber si la prolongación de la dieta de cafetería habría permitido ese logro, lo más probable es que no hubiera ocurrido así, teniendo en cuenta que la subnutrición, según este modelo experimental, es severa y conlleva un importante retraso del crecimiento. En seres humanos que experimentan dicho retraso y deben ser realimentados, las etapas en las que ocurren ambas circunstancias y su intensidad son circunstancias decisivas en cuanto a la capacidad de rehabilitación y normalización del peso, lo que se conoce como “catch-up”. Se trata de una cuestión todavía problemática para los neonatólogos y pediatras. De hecho, el uso de re-nutriciones “agresivas” para rehabilitar el peso de niños con retraso del crecimiento es controvertido, porque implica riesgos a medio y largo plazo, como se explica en una reciente revisión (Jee & col., 2014). Por ejemplo, los niños con subnutrición intrauterina que logran el “catch-up” hacia los dos años de vida pueden experimentar un incremento de la grasa central (Ong & col., 2000).

Las ratas previamente subnutridas y rehabilitadas con la fórmula de cafetería llegaron a igualar el peso de las controles bajo pienso *ad libitum* de la misma edad; por lo

tanto, en cierto modo lograron el “catch-up”. Sin embargo, como es evidente, ese peso no las define como ratas obesas. Otros parámetros antropométricos, como el índice de masa corporal, o el de Lee, también muestran que la dieta de cafetería no indujo obesidad en estos animales. Su diámetro abdominal experimentó un fuerte incremento debido, probablemente, a una expansión de la grasa visceral, como se discutirá después. Como se ha señalado antes, el severo retraso del crecimiento que experimentan estos animales y el carácter sólo moderadamente hipercalórico de la dieta de cafetería influyen decisivamente en este resultado. A pesar de ello, en las ratas con antecedentes de subnutrición dicha dieta tuvo un impacto particular sobre la proporción y distribución del tejido adiposo blanco, la lipemia y los depósitos de grasa ectópica, impacto muy diferente al que tuvo sobre las ratas controles. Ello indica que la subnutrición previa agrava las influencias patológicas de esa dieta.

### **3.4.- Efecto de la realimentación sobre la grasa visceral y subcutánea**

Como cabía esperar, la dieta de cafetería indujo un aumento de la masa total de grasa corporal en todas las ratas transferidas a esa fórmula. Sin embargo, considerando ese incremento en función de la cantidad de grasa que tenían antes de la transferencia, el cambio fue muy superior en los animales que habían estado previamente subnutridos. Ello indica que el efecto adipogénico de la fórmula hiperlipídica estaba potenciado por los antecedentes de subnutrición. La exposición a esa fórmula también aumentó el depósito graso específicamente visceral, en ambos grupos de ratas. Pero, de nuevo, ese efecto fue mucho más intenso en las subnutridas si se considera no la cifra total, sino la proporción relativa al contenido previo. De hecho, la proporción de grasa visceral de las ratas controles respecto del total corporal no fue modificado por la dieta de cafetería; en cambio, en las subnutridas la proporción de grasa visceral experimentó un fuerte incremento. Por otra parte, la subnutrición indujo un aumento de la proporción de grasa subcutánea en relación con la cantidad global; por el contrario, tras proporcionar a las ratas restringidas la dieta de cafetería, ese parámetro relativo disminuyó hasta igualarse al dato control.

Los resultados anteriores, referentes a los contenidos de grasas específicamente visceral y subcutánea frente al total, pueden resumirse así: en las ratas controles esos contenidos no experimentaron modificaciones después de ser transferidas a la dieta de cafetería; en cambio, en las ratas que habían sido previamente subnutridas, la transferencia implicó un aumento proporcional de la grasa visceral y una reducción de la

subcutánea. Se trata de una consecuencia notable, dado el papel etiopatogénico que desempeña la grasa visceral en la obesidad. Este tipo de grasa, localizado en la zona abdominal, es metabólicamente más activo que la subcutánea, produce más citoquinas y puede inducir insulino-resistencia (Carr & col., 2004). Confiere riesgo de alteraciones metabólicas, cardiovasculares (Rodríguez & col., 2007) y neoplásicas (Donohoe & col., 2011). Se ha señalado, incluso, que la adiposidad visceral podría disminuir la capacidad cognitiva en personas jóvenes (Yoon & col., 2012). En consecuencia, nuestros resultados sugieren que la subnutrición previa podría agravar las secuelas de una dieta hiperlipídica, a pesar de que por ser sólo moderadamente obesigénica, esa dieta no llegue a promover obesidad propiamente dicha. La ausencia de esta consecuencia debe estar asociada al hecho de que la subnutrición severa ocasiona una reducción importante del crecimiento. En todo caso, se sabe que una dieta rica en grasa puede tener repercusiones negativas (por ejemplo: vasculares y cardíacas) incluso sin llegar a inducir obesidad (Aubin & col., 2008).

### **3.5.- Efecto de la realimentación sobre la lipemia y la grasa ectópica**

Las ratas subnutridas de 70 días presentaban una baja concentración de triglicéridos séricos y, sin embargo, eran hipercolesterolémicas en comparación con sus controles. En pacientes con anorexia nerviosa se han encontrado niveles altos de colesterol, pese a su restricción nutricional, y se ha sugerido una posible alteración del metabolismo de dicho esteroide (Feillet & col., 2000). Al prolongar la restricción hasta los 9 meses, el colesterol plasmático se normalizó, aunque los triglicéridos permanecieron muy reducidos. Más importante es el hecho de que la dieta de cafetería promoviera un incremento de la concentración sérica de ambos lípidos en las ratas subnutridas sin modificar los correspondientes niveles en las controles; ello demuestra que esa fórmula posee un efecto dislipidémico especialmente marcado cuando hay antecedentes de subnutrición. Es bien sabido que las dietas hipercalóricas suponen un riesgo de dislipemia, tanto en humanos como en roedores (Akiyama & col., 1996; Sumiyoshi & col., 2006); la ausencia de efectos al respecto en las ratas controles observada en este trabajo vuelve a poner de manifiesto el carácter sólo moderadamente hipercalórico de nuestra fórmula de cafetería.

El tejido que almacena mayor cantidad de lípidos es el adiposo. Pero también pueden acumularse en otros tejidos (sobre todo los triglicéridos), especialmente en hígado, músculo y corazón, formándose depósitos denominados “ectópicos”. Esas gotitas

de grasa se localizan en el citoplasma y pueden provocar disfunciones celulares, fenómeno designado como lipotoxicidad (Schaffer, 2003). La nutrición representa un papel importante en dicho fenómeno. Así, la obesidad constituye un claro factor de riesgo para la formación de depósitos ectópicos (van Herpen & Schrauwen-Hinderling, 2008). La subnutrición indujo el fenómeno opuesto: una reducción de la cantidad de triglicéridos almacenados en el hígado. En este sentido se sabe que la esteatosis asociada a la obesidad puede ser revertida mediante restricción calórica (Tiikkainen & col., 2003), un hecho coherente con ese resultado. Por el contrario, las dietas hiperlipídicas incrementan el depósito lipídico hepático, tanto en roedores (Samuel & col., 2004) como en humanos (Westerbacka & col., 2005). En nuestro caso, la transferencia a la fórmula de cafetería no indujo esteatosis en las ratas controles pero incrementó muy marcadamente la concentración de triglicéridos en el hígado de los animales previamente subnutridos. De nuevo estos resultados muestran la vulnerabilidad incrementada asociada a la subnutrición en cuanto a ese efecto negativo de la dieta hiperlipídica, a pesar de que la densidad calórica de la fórmula utilizada no era exageradamente alta.

La acumulación de triglicéridos en el hígado constituye un factor de riesgo *per se* para algunas de las alteraciones características del síndrome metabólico, en particular la insulino-resistencia. Se ha visto que ese riesgo es independiente de la adiposidad global o visceral (Wicklow & col., 2012). Por lo tanto, la esteatosis de las ratas subnutridas-realimentadas, al margen de los efectos de esa doble pauta sobre su adiposidad, es un resultado claramente indicativo del efecto amplificador de la subnutrición sobre las consecuencias de una dieta hiperlipídica. En seres humanos existe una correlación entre la cantidad de grasa ectópica y sus efectos sobre la sensibilidad a la insulina, aunque no se trate de personas obesas (Wicklow & col., 2012). Sería una situación comparable a la que aquí se produce en las ratas subnutridas-realimentadas.

En este trabajo no se han evaluado marcadores indicativos de daño hepático, como las clásicas alanina aminotransferasa o aspartato aminotransferasa. Sin embargo, algunos autores han demostrado la existencia de una correlación entre la concentración de ácido úrico en el hígado y el daño hepático asociado a esteatosis no alcohólica (Sánchez-Lozada & col., 2010). Nosotros hemos encontrado que el ácido úrico hepático está disminuido en las ratas subnutridas pero se incrementa por encima de los valores controles cuando se transfieren a la dieta de cafetería, lo que sugiere un daño hepático en estos animales que no parece producirse en los controles sometidos a esa dieta.

En el músculo existen, espontáneamente, depósitos de microgotas lipídicas. Se ubican en el citoplasma de las fibras, próximos a las mitocondrias; ello sugiere que esos lípidos se utilicen como fuente de energía, especialmente cuando se realiza un ejercicio intenso (van Herpen & Schrauwen-Hinderling, 2008). El entrenamiento físico induce un aumento fisiológico de esos depósitos (Schrauwen-Hinderling & col., 2003). Pero también se incrementan en situaciones patológicas, lo que conduce a insulino-resistencia en el tejido muscular, como se revisa en una reciente publicación (Zhang & col., 2013). Nuestros datos muestran un extraordinario aumento de los triglicéridos contenidos en el músculo esquelético de las ratas subnutridas y realimentadas con la dieta de cafetería, sin que ese mismo efecto aparezca en las controles. Recientemente, Romero & col. han descrito un incremento del depósito ectópico de lípidos en el gastrocnemius de ratas que, sin previa subnutrición, se someten a una fórmula de cafetería; sin embargo, la densidad calórica de esa fórmula está muy por encima de la aplicada en este trabajo (Romero & col., 2014). De modo comparable, Chen & col (2011) han encontrado que una dieta hiperlipídica tras subnutrición provoca un aumento de los lípidos musculares; pero, de nuevo, las calorías de origen lipídico de esa dieta son más de dos veces superiores a las que contiene nuestra fórmula de cafetería. En ese contexto, nuestros resultados confirman que la subnutrición previa aumenta la susceptibilidad de padecer depósitos de lípidos ectópicos en el músculo, incluso con una dieta sólo moderadamente hipercalórica, la cual sin embargo es claramente insuficiente para inducir esa consecuencia cuando no hay antecedentes de subnutrición. Algunos autores han sugerido recientemente que la facilidad para acumular lípidos ectópicos (e incluso la lipotoxicidad derivada de ello) formaría parte de la “programación fetal” (Pruis & col., 2013). En esa línea podrían considerarse los resultados de Fainberg & col. (2013), que han visto que en ovejas que padecieron subnutrición intrauterina y más tarde fueron convertidas en obesas, aumentaron los depósitos grasos en los riñones (junto con otras alteraciones), lo que no ocurrió en ovejas que no experimentaron malnutrición precoz. Se diría que esas alteraciones renales quedaron “programadas” por el status de subnutrición precoz.

### **3.6.- Insulina: niveles séricos y sensibilidad global**

La subnutrición está asociada a hipoinsulinemia, como se ha visto en este y otros trabajos (Gavete & col., 2002; Escrivá & col., 1992). La causa principal es una reducción de la masa de células  $\beta$  (Martín & col., 1997). Paradójicamente, observamos que al prolongar la subnutrición la insulinemia aumentó, hasta alcanzar el valor control. Este

hecho inesperado deriva, probablemente, de la capacidad regenerativa de las células  $\beta$ , puesta de manifiesto en ratas adultas subnutridas (Fernández & col., 2006). Cuando esos animales fueron sometidos a la dieta de cafetería, la insulinemia disminuyó; este efecto podría deberse a la hiperleptinemia suscitada por dicha dieta (que comentaremos en la siguiente sección), ya que la leptina inhibe la expresión de la insulina (Ahima & col., 1998). La falta de respuesta por parte de las ratas controles podría deberse a una menor sensibilidad de éstas a la hormona.

Los resultados obtenidos en los experimentos de “clamp” confirman que la subnutrición aumenta la sensibilidad a la insulina, un efecto obtenido previamente por muchos autores (Dean & col., 1998; Okitolonda & col., 1987). Al someter a las ratas a la dieta de cafetería se produjo una reducción de la sensibilidad, tanto en las ratas previamente subnutridas como en las controles; este resultado confirma un hecho bien establecido: que las dietas hipercalóricas promueven insulino-resistencia. Se sabe, en efecto, que ese tipo de comida ingerido en exceso y con carácter crónico es un factor decisivo para que se desarrollen las características fenotípicas propias del síndrome metabólico, entre las que destaca la indicada resistencia, como se ha revisado recientemente (Weickert, 2012). Un resultado destacable es que la pérdida de sensibilidad experimentada por las ratas subnutridas es muy superior a la que se produjo en las controles. Probablemente ello se relaciona con el hecho de que la respuesta hormonal inicial (antes de la transferencia a la dieta de cafetería) también es mucho más alta. Pero, en todo caso, merece destacarse que un episodio de subnutrición previo determina que la magnitud del descenso en la insulino-sensibilidad tras una dieta hipercalórica esté incrementada.

La insulino-resistencia está relacionada con alteraciones en la vía de señalización de la hormona, debidas a su vez al fenómeno de lipotoxicidad asociado a los depósitos de grasa ectópica. Esta grasa deprime la respuesta hormonal por medio de una serie de mecanismos hoy muy investigados, como: acumulación de ceramida, aumento del diacilglicerol y de la actividad de la PKC, etc. (revisado recientemente por Borén & col., 2013). En el caso de las ratas controles, la disminución de insulino-sensibilidad no se produce con un aumento concomitante del depósito ectópico de lípidos. Por ello, cabe sospechar que los mecanismos que inducen la resistencia de estos animales sean de otra naturaleza. Se puede sugerir, por ejemplo, que esa resistencia estuviera relacionada con algunas citoquinas, ya que la masa global de tejido adiposo (en donde éstas se originan) también está expandida en estas ratas.

### 3.7.- Efecto de la subnutrición sobre la leptinemia

La leptina presente en la sangre de los roedores lactantes no se genera en su tejido adiposo, a diferencia de lo que ocurre en la edad adulta, ya que poseen una cantidad muy limitada de ese tejido. Durante esa etapa la leptina procede de la leche y es fácilmente absorbida por el estómago (Sánchez & col., 2005). Alrededor del día 10 de vida la concentración sanguínea de esta hormona experimenta un incremento agudo y transitorio, fenómeno conocido como “ola de leptina” (Ahima & col., 1998). En este trabajo se confirma dicha “ola” en las ratas controles, así como su ausencia prácticamente total en las subnutridas. De hecho, éstas presentan una hipoleptinemia marcada durante la segunda semana de vida. Lo más probable es que ello se deba a una disminución de la producción de leche y/o de leptina por parte de la madre subnutrida; pero no puede descartarse que, además, la subnutrición disminuya la capacidad de absorción estomacal de esta hormona. En otros modelos con desequilibrios nutricionales precoces también se ha visto que la hiperleptinemia característica neonatal está alterada. Por ejemplo, se encuentra incrementada en ratas cuyas madres experimentan obesidad inducida por una dieta experimental (Rajia & col., 2010), mientras que disminuye en animales procedentes de madres subnutridas (Delahaye & col., 2008).

Hemos observado una marcada hipoleptinemia en las ratas subnutridas cuando llegan a la edad adulta; ese resultado sí que puede ser atribuido al déficit adiposo propio de esos animales. Cuando se realimentaron con la fórmula de cafetería se incrementó la leptina en la sangre en ambos grupos de ratas, controles y subnutridas, en paralelo a la expansión que experimentó su tejido adiposo.

Un aspecto muy importante de la leptina en los roedores es que durante su inmadurez no tiene la función de reducir el apetito; su papel principal en esa etapa precoz consiste en promover el desarrollo de los circuitos hipotalámicos implicados en la homeostasis energética. Durante las dos primeras semanas de vida, las neuronas NPY (véase la sección siguiente) proyectan axones desde el núcleo arcuato hacia el paraventricular y la leptina es un factor esencial para que se establezcan esas conexiones; también regula las proyecciones desde las neuronas POMC (sección siguiente) hacia otros núcleos (Bouret & col., 2004). Por ello, el ratón deficitario en leptina presenta profundas alteraciones en esos circuitos (Ren & Shen, 2010). Yura & col. han demostrado la existencia de alteraciones en el hipotálamo de ratones prenatalmente subnutridos, en los cuales la ola de leptina ocurre prematuramente; más adelante, esos animales

desarrollan un fenotipo propenso a la obesidad (Yura & col., 2005). De modo paralelo, se ha visto que la ola de leptina que se produce en ratas procedentes de madres obesas es excesivamente larga y que estos animales exhiben ulteriormente hiperfagia (Kirk & col., 2009).

Con respecto al ser humano, existen pocas investigaciones acerca del papel de la leptina perinatal sobre el hipotálamo. En la sangre del cordón umbilical los niveles de esta hormona se correlacionan directamente con el peso a término; tras el nacimiento, la leptina va declinando progresivamente hasta el sexto día de vida postnatal (Matsuda & col., 1999). Los niños con retraso del crecimiento intrauterino presentan niveles séricos de leptina reducidos (Ren & Shen, 2010). En opinión de algunos autores, los efectos de este factor sobre el hipotálamo humano inmaduro deben producirse antes del nacimiento.

### **3.8.- Efecto de la subnutrición sobre péptidos orexigénicos y anorexigénicos**

Dado el papel crucial de la leptina neonatal en el establecimiento de algunos circuitos neuronales hipotalámicos y en vista de la profunda hipoleptinemia que presentan las ratas lactantes subnutridas, podría esperarse que la subnutrición precoz alterase el desarrollo de los circuitos que participan en la regulación de la ingesta, o la expresión de los factores implicados en esa regulación. El núcleo arcuato del hipotálamo contiene dos importantes subpoblaciones de neuronas al respecto: unas expresan neuropéptidos orexigénicos, como el NPY, mientras que otras expresan proopiomelanocortina (POMC) y otros factores anorexigénicos. Nuestros resultados ponen de manifiesto que las ratas subnutridas presentan un incremento importante del NPY en la etapa adulta, así como una marcada reducción de POMC que comienza a establecerse hacia la mitad de la lactancia. Delahaye & col. ya habían observado que la subnutrición durante la etapa perinatal afecta a las neuronas POMC del núcleo arcuato de las ratas neonatales (Delahaye & col., 2008). Por lo tanto, nuestros datos demuestran que las ratas que se han mantenido subnutridas hasta los 70 días, presentan unas alteraciones hipotalámicas adecuadas para potenciar el hambre y deprimir la saciedad. Estas alteraciones explican que cuando en esa etapa vital se suministra a estos animales una dieta de cafetería *ad libitum* la consumen con carácter hiperfágico, como se ha visto en las correspondientes secciones anteriores. Por otra parte, en la adquisición de ese perfil hipotalámico alterado debe estar implicado de alguna manera el profundo déficit en la hiperleptinemia fisiológica observado en estas ratas.

### 3.9.- Efecto de la subnutrición sobre la sensibilidad hipotalámica a la leptina

En el núcleo arcuato del hipotálamo se encuentran abundantes receptores de leptina y por ello es una región muy sensible a esta hormona, que ejerce profundos efectos anorexigénicos: activa las neuronas POMC e inhibe las NPY; la consecuencia es una disminución del apetito. Los resultados descritos en las secciones anteriores sugerían la posibilidad de que la subnutrición, que inducía un perfil hipotalámico tendente a la hiperfagia con respecto a las expresiones de NPY y POMC, disminuyese la capacidad de respuesta de esta región del SNC a la leptina, potenciando el cuadro anorexigénico. Para analizar esa posibilidad administramos inyecciones de esta hormona en el tercer ventrículo y evaluamos los efectos producidos en su vía de señales. Las paredes laterales de esa cavidad así como su zona inferior son limítrofes con el hipotálamo, de modo que la leptina inyectada en ella accede directamente a este órgano.

Observamos que la leptina estimuló la fosforilación del receptor ObRb, JAK2 y STAT3 en las ratas controles, como era previsible, pero no indujo ninguna de estas respuestas en las subnutridas. Este resultado indicó claramente que la subnutrición estaba asociada a un profundo déficit de sensibilidad hipotalámica a la leptina. Yura & col. observaron que la administración de leptina en ratones adultos que habían experimentado subnutrición intrauterina no activaba STAT3; sin embargo, en ese caso la causa era una deficiencia en la transferencia de esta hormona al SNC a través de la barrera hematoencefálica. En esos ratones, la resistencia a la leptina disminuyó sus efectos anorexigénicos y propició la obesidad (Yura & col., 2005). En nuestros experimentos, la vía de acceso de la leptina al SNC obviaba la BHE; en consecuencia, los resultados demuestran que la subnutrición indujo resistencia a la leptina en las neuronas hipotalámicas. Las alteraciones en la leptinemia que experimentan las ratas subnutridas durante las etapas claves del desarrollo de los circuitos hipotalámicos (discutidas en las secciones anteriores) deben ser importantes en el establecimiento ulterior de esta resistencia. En línea con ello, se ha visto que si las acciones postnatales de esta hormona se bloquean por medio de antagonistas aparece, más tarde, leptino-resistencia, así como propensión a la obesidad (Djiane & Attig, 2008). Se han descrito situaciones de resistencia central a la leptina en roedores que conducen al desarrollo de obesidad; pero lo típico es que se trate de animales hiperleptinémicos (Munzberg & col., 2004; El-Haschimi & col., 2000).

En las ratas subnutridas también hemos visto que se produce un fuerte incremento de la concentración hipotalámica de SOCS3. García & col. ya habían observado un aumento de la expresión de esta proteína en ratas procedentes de madres subnutridas durante la gestación (García & col., 2010). SOCS3 es un regulador a la baja de la vía de señales de la leptina (Starr & col., 1997), de modo que este resultado es coherente con el cuadro de resistencia establecido. Sin embargo, la expresión de SOCS3 está promovida por la propia leptina, constituye un efecto “feed-back” negativo. En consecuencia, es difícil explicar porqué aumenta su expresión en coincidencia con una situación de resistencia a la hormona. En hepatocitos se ha visto que la expresión de SOCS3 puede ser inducida por IL-6 (Senn & col., 2002); por otra parte, Desai & col. han comprobado que la subnutrición precoz está asociada a un cuadro inflamatorio basal (Desai & col., 2009). Ambos hechos sugieren la posibilidad de que la elevada concentración de SOCS3 en las ratas subnutridas esté relacionada con un incremento de citoquinas inflamatorias en el hipotálamo.

### **3.10.- Efecto de la subnutrición sobre la sensibilidad hipotalámica a la insulina**

De acuerdo con lo que se ha comentado en la sección anterior con respecto a la leptina, la insulina introducida en el tercer ventrículo también accede inmediatamente a las neuronas hipotalámicas; por lo tanto, la inyección intra-cerebroventricular permite un análisis específico de la capacidad de respuesta de esas células a la hormona.

El incremento de SOCS3 que experimentan las ratas subnutridas (sección anterior) podría tener repercusiones sobre la vía insulínica, ya que se ha visto que este factor, regulador negativo de las citoquinas, también induce la degradación de los IRSs en tejidos periféricos (Shi & col., 2004). Sin embargo, nuestros datos indican que la expresión hipotalámica de los IRSs, así como la de otras proteínas situadas igualmente en las primeras etapas de la vía de señales, no fueron afectadas por la subnutrición. La insulina exógena indujo la fosforilación del receptor de insulina en los dos grupos de animales, pero esta respuesta fue más intensa en las ratas restringidas que en las controles. Sardinha & col. también encontraron una activación incrementada de este receptor en ratas adultas con antecedentes de subnutrición fetal (Sardinha & col., 2006). En nuestro caso se produjo una paradoja: a pesar de la mayor activación del receptor causada por la hormona, el grado de fosforilación de Akt fue idéntico en las dos poblaciones de ratas. El hecho más destacable, sin embargo, se refiere a GSK3, un

importante transductor del efecto anorexigénico de la insulina: en los animales subnutridos, esta hormona no indujo su fosforilación, una respuesta que sí ocurrió en sus controles. Este resultado demuestra que la subnutrición causó resistencia central a la insulina. Otros autores han descrito estados de resistencia hipotalámica a esta hormona en fetos subnutridos (Liu & col, 2013), así como en ratas que desarrollaron obesidad después de ser sometidas a dietas hipercalóricas, similares a las occidentales (Prada & col., 2005). Nuestros datos no explican porqué la insulina no induce la fosforilación de GSK3, a pesar de que la hormona promueve la activación de Akt. Podemos sugerir que otras kinasas o fosfatasa intervengan en esta falta de respuesta. Por ejemplo, la PKC también actúa sobre GSK3 (Tsuji & col., 2000).

La cantidad de la fosfatasa PTP1B está muy reducida en el hipotálamo de las ratas subnutridas. Ello está de acuerdo con la intensa activación del receptor observada en estos animales tras estímulo insulínico, ya que PTP1B induce la defosforilación del receptor (rev. por Tiganis, 2013). Sin embargo, el descenso de PTP1B no es coherente con el establecimiento de un cuadro de insulino-resistencia. Por el contrario, esas situaciones suelen coincidir con una mayor expresión de esta fosfatasa (Benzler & col., 2012). Más aún: PTP1B también regula a la baja la señal de la leptina (Zabolotny & COL., 2002), la cual -como hemos discutido antes- está disminuida en las ratas subnutridas. En consecuencia, la menor concentración de PTP1B en el hipotálamo de las ratas subnutridas es un resultado difícil de explicar con los datos de que disponemos. Podemos sugerir que en situaciones de insulino-resistencia central, esa disminución constituiría una adaptación destinada a evitar que la pérdida de las respuestas hormonales se agravase. Se sabe que la activación del receptor de insulina es importante en procesos de sinaptogénesis y supervivencia celular (Bourdeau & col., 2005), de modo que su elevada fosforilación en respuesta a la hormona en las ratas subnutridas podría tener alguna significación en aspectos fisiológicos distintos a los relacionados con el control de la ingesta.

Nuestros resultados indican que la administración de insulina tampoco incrementa el estado de fosforilación de la P70S6K en Thr389 (que induce activación) en el hipotálamo de las ratas subnutridas, pero sí en sus controles. La estimulación de esta kinasa se relaciona indirectamente con uno de los efectos típicos de la insulina en el hígado: la inhibición de la producción de glucosa endógena. A través de la activación de P70S6K hipotalámica, la hormona promueve la apertura de canales de K<sup>+</sup> ATP-dependientes (Ono, 2009); ello, a su vez, estimula una rama del nervio vago descendente

hasta el hígado, lo que conduce a una disminución de la producción de glucosa. Se trata de uno de los mecanismos que permiten integrar el hipotálamo y los tejidos periféricos en la homeostasis glucídica, como recientemente se ha revisado (Carey & col., 2013). La falta de efecto de la insulina sobre la P70S6K en las ratas subnutridas probablemente deriva del hecho de que en estado basal ya se encuentra muy fosforilada en esos animales: en la misma proporción en que lo está en los controles después del tratamiento con insulina. La kinasa mTOR fosforila la P70S6K; sin embargo, el estado basal muy fosforilado de ésta en las ratas subnutridas no parece causado por una mayor actividad de mTOR, puesto que no hemos observado diferencias al respecto al compararlas con sus controles.

Estos resultados sugieren dos cosas: a) en las ratas subnutridas se establece un estado de resistencia hipotalámica a la insulina en cuanto a la activación de la P70S6K; b) por eso mismo, en estas ratas podrían estar produciéndose ya en estado basal los efectos del nervio vago, frenando la producción hepática de glucosa. Esto último es coherente con el hecho de que la subnutrición induce un aumento de la sensibilidad global a la insulina (sección 1.5 de la Introducción), dado que esta hormona actúa sobre el hígado en ese mismo sentido, es decir: suprimiendo la producción de glucosa. En células cultivadas y en músculo *in vivo* se ha visto que la activación de la P70S6K puede conducir a una fosforilación del IRS-1 en Ser; ello inhibe la activación de la PI3K, siendo un clásico proceso de retroalimentación negativa que, en condiciones patológicas, puede llegar a inducir insulino-resistencia (Tremblay & col., 2007). Sin embargo, nuestros datos demuestran que la administración de insulina promueve la activación de Akt, tanto en las ratas subnutridas como en las controles. Dado que la situación de Akt en la vía es posterior a los IRSs, esos datos indican que ese mecanismo de desensibilización no se ha producido en el hipotálamo de las ratas subnutridas.

### **3.11.- Efecto de la subnutrición sobre las MAPKs en el hipotálamo**

En diferentes estudios sobre posibles mecanismos implicados en las resistencias hipotalámicas a la insulina y leptina se examinan los efectos que podría tener un estado de inflamación local, con la producción de citoquinas y consecuente activación de señales amortiguadoras de los efectos de esas hormonas (Velloso & col., 2008). Dentro de ese contexto tiene especial importancia el posible papel de las MAP kinasas. Por ello, en este trabajo hemos llevado a cabo un primer intento de abordar esta cuestión, analizando

estas proteínas en el hipotálamo de las ratas subnutridas, dado que presentan resistencia a la leptina e insulina. Hemos encontrado que la JNK se encuentra más activada en los animales restringidos, en situación basal. De modo similar a lo que hemos comentado para la P70S6K (sección anterior), este cambio podría tener un efecto depresor sobre los IRSs, porque la JNK también cataliza su fosforilación en Ser, de consecuencias inhibitoras. Sin embargo, ya hemos considerado el hecho de que en las ratas subnutridas la fosforilación de Akt por la insulina no se encuentra reducida, lo cual permite descartar una activación deficiente de los IRSs. Por otra parte, se sabe que JNK es fuertemente activada por el estrés del retículo endoplásmico (Hotamisligil, 2010), condición que puede ser inducida por muchos factores ambientales, entre ellos la malnutrición (rev. por Kitamura, 2013). Así que nuestros resultados podrían estar indicando que en el hipotálamo de las ratas subnutridas se establece una situación de estrés del retículo endoplásmico, posibilidad que merecería la pena investigar.

En coincidencia con lo que hemos visto para GSK3 y P70S6K, la insulina no indujo la activación de ERK en el hipotálamo de las ratas subnutridas, debido a que su grado de fosforilación basal ya se encontraba incrementado. Se sabe que en el núcleo del tracto solitario es necesaria la activación de ERK por la colecistoquinina para que ésta suscite sus efectos supresores del apetito (Sutton & col., 2005). El papel de esta kinasa sobre la regulación hipotalámica de la ingesta todavía no está bien establecido, aunque se sabe que el ayuno induce su activación (Ueyama & col., 2004); ello concuerda con la elevada fosforilación basal que hemos encontrado en las ratas subnutridas. Por otra parte, recientemente se ha visto que la estimulación de ERK por la leptina en los tanicitos (células gliales que revisten el tercer ventrículo) es necesaria para el transporte de esta hormona hacia las neuronas, en las que induce sus efectos anorexigénicos; de ello se ha deducido que la falta de activación de ERK en esas glías podría causar resistencia a la leptina (Balland & col., 2014). Sin embargo, los tanicitos constituyen una población celular minoritaria; nuestros datos se han obtenido en el hipotálamo entero, por ello pensamos que no reflejan lo que sucede específicamente en esas células. Nikitina & col. han propuesto que otra función del ERK hipotalámico sería estimular la secreción de vasopresina, hormona antidiurética (Nikitina & col., 2014). Así que su activación crónica en las ratas subnutridas podría estar relacionada con una alteración de la diuresis. Por otra parte, esta MAP kinasa interviene, como es sabido, en otras muchas funciones neuronales: organización del citoesqueleto, sinaptogénesis, apoptosis, etc. (Haddad,

2005); así que nuestros resultados también sugieren alteraciones en alguna de estas funciones en el hipotálamo de las ratas subnutridas.

No hemos encontrado cambios en el estado de fosforilación basal de p38MAPK asociados a la subnutrición. Se sabe que esta kinasa es activada por el ayuno en algunas regiones hipotalámicas, pero no se trata de una respuesta uniforme, ni coincide siempre con la activación de ERK (Morikawa & col., 2004). Ello podría explicar los distintos resultados obtenidos entre ambas MAPKs. Por otra parte, la falta de fosforilación de p38MAPK por la insulina en ambas poblaciones de ratas, a diferencia de lo que ocurre con Akt (en todos los animales) y con P70S6K ó ERK (en los controles), sugiere que la activación de esa kinasa tenga una cinética de estimulación diferente a la de esas otras proteínas.

Pensamos que las resistencias hipotalámicas a la leptina e insulina en las ratas subnutridas actuarán de manera sinérgica para que sus efectos anorexigénicos en el hipotálamo se encuentren fuertemente deprimidos. Ello, junto con el bajo nivel sanguíneo que presentan ambas hormonas, debe ser un factor causal de su hiperfagia y del desarrollo de su adiposidad visceral. Es importante recordar que todos los resultados indicativos de la aparición de esas resistencias, los hemos obtenido en las ratas antes de ser transferidas a la dieta de cafetería. No tenemos datos acerca de la persistencia de estas alteraciones después de dicha transferencia, aunque sí una importante información indirecta: la hiperfagia que presentan estos animales, en términos de ingesta calórica. Sin embargo, el mantenimiento de las alteraciones más allá de la etapa de restricción que las origina es el concepto que subyace en la hipótesis de la “programación precoz”. Recientemente se ha demostrado que una vez que el perfil hipotalámico ha cambiado hacia un fenotipo inductor de hiperfagia y obesidad, es difícil readaptarlo mediante manipulaciones de la dieta (Srinivasan & col., 2013). Pensamos que esto es lo que debe ocurrir en cuanto a los cambios ocasionados por la subnutrición precoz y crónica en el modelo experimental estudiado en este trabajo.





## **VI. CONCLUSIONES**



## VI. CONCLUSIONES

### Conclusiones del primer objetivo:

- ❖ 1.1.- La subnutrición precoz genera un cuadro de hipersensibilidad a la insulina y resistencia al glucagón en el hígado de las ratas lactantes.
- ❖ 1.2.- Ese cuadro se opone a la situación que es característica en esa etapa de inmadurez, en la que existe insulino-resistencia y deben ser intensos los efectos del glucagón, para que estén muy activas la glucogenolisis y gluconeogénesis. Por ello, la subnutrición cursa con hipoglucemia.
- ❖ 1.3.- A pesar de esta alteración endocrina, el hígado de las ratas subnutridas produce y exporta una elevada cantidad de cuerpos cetónicos, con la consecuente hiperketonemia.
- ❖ 1.4.- El desequilibrio de estos dos sustratos, glucosa y cuerpos cetónicos, en una etapa tan vulnerable podría interferir en el desarrollo de algunos órganos, particularmente el SNC.

### Conclusiones del segundo objetivo:

- ❖ 2.1.- La subnutrición precoz induce un incremento del contenido de glucógeno en el córtex de las ratas lactantes; este aumento se produce en los astrocitos, sin afectar a las neuronas.
- ❖ 2.2.- En las ratas lactantes, la insulina administrada por vía intraperitoneal alcanza rápidamente el córtex y aumenta el grado de fosforilación de su receptor.
- ❖ 2.3.- La subnutrición induce un aumento notable en el córtex de la rata lactante de las formas fosforiladas de las kinasas: GSK3, AMPK, p38MAPK y JNK.
- ❖ 2.4.- La subnutrición no parece afectar significativamente la tasa apoptótica cortical durante la lactancia: no altera el equilibrio entre factores apoptóticos y antiapoptóticos ni la caspasa 3 activa.

### Conclusiones del tercer objetivo:

- ❖ **3.1.-** En el hipotálamo de ratas adultas precozmente subnutridas se incrementa el NPY y disminuye el POMC. Al mismo tiempo, aparece resistencia a dos hormonas anorexigénicas: insulina y leptina. Todas estas alteraciones conducen a una situación de hiperfagia.
- ❖ **3.2.-** La subnutrición disminuye la leptina sérica. Es muy destacable una profunda reducción de la hiperleptinemia fisiológica propia de la lactancia. Dado el papel de la leptina sobre la maduración del hipotálamo, las alteraciones de éste así como la consecuente hiperfagia parecen estar relacionadas con el déficit precoz de esta hormona.
- ❖ **3.3.-** Una dieta moderadamente hiperlipídica no llega a ser obesigénica para las ratas con un antecedente de subnutrición severa. Sin embargo, tiene varias consecuencias patológicas que no se producen o son menos intensas en las ratas sin restricción nutricional previa. Esas consecuencias son:
  - a) aumento de la proporción específica de grasa visceral.
  - b) hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia.
  - c) depósito ectópico de triglicéridos en hígado y músculo esquelético, junto con un aumento del ácido úrico hepático.
  - d) disminución de la sensibilidad global a la insulina, en una proporción mucho mayor que en ausencia de subnutrición previa.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



## VII. BIBLIOGRAFÍA

- A** Adle-Biassette H, Olivier P, Verney C, Fontaine RH, Evrard P, Hénin D, Massias L, Gressens P, Baud O (2007) Cortical consequences of in vivo blockade of monocarboxylate transport during brain development in mice. *Pediatr Res*, 61: 54-60.
- Adzic M, Djordjevic A, Demonacos C, Krstic-Demonacos M, Radojic MB (2009) The role of phosphorylated glucocorticoid receptor in mitochondrial functions and apoptotic signalling in brain tissue of stressed Wistar rats. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(11): 2181-2188.
- Ahima RS & Flier J (2000) Leptin. *Annu Rev Physiol*, 62: 413-437.
- Ahima S, Prabakaran D, Flier JS (1998) Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. *J Clin Invest*, 101: 1020-1027
- Aje TO & Miller M (2009) Cardiovascular disease: a global problem extending into the developing world. *World J Cardiol*, 1(1): 3-10.
- Akiyama T, Tachibana I, Shirohara H, Watanabe N, Otsuki M (1996) High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract*, 31(1-3): 27-35.
- Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*, 20: 470-475.
- Allaman I, Pellerin L, Magistretti J (2004) Glucocorticoids modulate neurotransmitter-induced glycogen metabolism in cultured cortical astrocytes. *J Neurochem*, 88: 900-908.
- Almeida SS, Tonkiss J, Galler JR (1996) Prenatal protein malnutrition affects exploratory behaviour of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol. Behav*, 60: 675-680.
- Álvarez E, Fernández S, Blázquez E (1986) Effect of maternal food restriction on circulating insulin and glucagon levels and on liver insulin and glucagon binding sites of fetal and suckling rats. *Diabetes Metab*, 12: 337-345.
- Amrani A, Jafarian-Tehrani M, Mormède P, Durant S, Pleau JM, Haour F, Dardenne M, Homo-Delarche F (1996) Interleukin-1 effect on glycemia in the non-obese diabetic mouse at the pre-diabetic stage. *J. Endocrinol*, 148: 139-148.

- Aromataris EC, Roberts ML, Barritt GJ, Rychkov GY (2006) Glucagon activates Ca<sup>2+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in rat hepatocytes. *J Physiol*, 573: 611-625.
- Astrup A & Finer N (2000) Redefining Type 2 diabetes: 'Diabesity' or 'Obesity Dependent Diabetes Mellitus'? *Obesity Reviews*, 1(2): 57-59.
- Aubin MC, Lajoie C, Clément R, Gosselin H, Calderone A, Perrault LP (2008) Female rats fed a high-fat diet were associated with vascular dysfunction and cardiac fibrosis in the absence of overt obesity and hyperlipidemia: therapeutic potential of resveratrol. *J Pharmacol Exp Ther*, 325(3): 961-968.
- Awad N, Gagnon M, Meisser C (2004) The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and cognitive function. *J. Clin. Exp. Neuropsychol*, 26: 1044-1080.
- B** Baglioni S, Cantini G, Poli G, Francalanci M, Squecco R, Di Franco A, Borgogni E, Frontera S, Nesi G, Liotta F, Lucchese M, Perigli G, Francini F, Forti G, Serio M, Luconi M (2012) Functional Differences in Visceral and Subcutaneous Fat Pads Originate from Differences in the Adipose Stem Cell. *PLoS One*, 7(5): e36569. doi: 10.1371/journal.pone.0036569.
- Balland E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, Rasika S, Falluel-Morel A, Anouar Y, Dehouck B, Trinquet E, Jockers R, Bouret SG, Prévot V (2014) Hypothalamic Tanycytes Are an ERK-Gated Conduit for Leptin into the Brain. *Cell Metab*, 19(2): 293-301.
- Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG (2000) Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem*, 275: 14563-14572.
- Banks WA & Farrell CL (2003) Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285: E10-E15.
- Banks WA, Owen JB, Erickson MA (2012) Insulin in the brain: There and back again. *Pharmacology & Therapeutics*, 136: 82-93.
- Banting FG & Best CH (1922) The internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med*, 7: 251-266.
- Barker DJ (2004) The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl*, 93: 26-33.
- Barker DJP (1992) Fetal growth and adult disease. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 99(4): 275-276.

- Baura GD, Foster DM, Porte D Jr, Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, Schwartz MW (1993) Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo: A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest*, 92: 1824-1830.
- Beisel WR (1996) Nutrition in pediatric HIV infection: setting the research agenda. Nutrition and immune function: overview. *J Nutr*, 126(10 Suppl): 2611S-2615S.
- Belke DD, Larsen TS, Gibbs EM, Severson DL (2001) Glucose metabolism in perfused mouse hearts overexpressing human GLUT-4 glucose transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280(3): E420-E427.
- Benedict C, Hallschmid M, Hatke A, Schultes B, Fehm HL, Born J, Kern W (2004) Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 29: 1326-1334.
- Bénéfice E, Garnier D, Simondon KB, Malina RM (2001) Relationship between stunting in infancy and growth and fat distribution during adolescence in Senegalese girls (2001) *Eur. J Clin Nutr*, 55: 50-58.
- Benzler J, Ganjam GK, Krüger M, Pinkenburg O, Kutschke M, Stöhr S, Steger J, Koch CE, Ölkrug R, Schwartz MW, Shepherd PR, Grattan DR, Tups A (2012) Hypothalamic glycogen synthase kinase 3 $\beta$  has a central role in the regulation of food intake and glucose metabolism. *Biochem J*, 447(1): 175-184.
- Bergersen LH (2007) Is lactate good for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience*, 145: 11-19.
- Bertram C, Trowern AR, Copin N, Jackson AA, Whorwood CB (2001) The maternal diet during pregnancy programs altered expression of glucocorticoid receptor and type 2 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology*, 142: 2841-2853.
- Bertram CE & Hanson MA (2001) Animal models and programming of the metabolic syndrome. *Br Med Bull*, 60: 103-121.
- Beylot M (1996) Regulation of in vivo ketogenesis: role of free fatty acids and control by epinephrine, thyroid hormones, insulin and glucagon. *Diabetes Metab*, 22: 299-304.
- Bhoomika RK, Shobini LR, Chandramouli BA (2008) Cognitive development in children with chronic protein energy malnutrition. *Behavioral and Brain Functions*, 4:31. doi: 10.1186/1744-9081-4-31.
- Biessels GJ & Gispen WH (2005) The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? *Neurobiol Aging*, 6: 36-41.

- Bjørnbæk C & Kahn BB (2004) Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res*, 59: 305-31.
- Bjørnbæk C, Uotani S, da Silva B, Flier JS (1997) Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem*, 272: 32686-32695.
- Bligh EG & Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol*, 37: 911-917.
- Blondeau B, Garofano A, Czernichow P, Bréant B (1999) Age-dependent inability of the endocrine pancreas to adapt to pregnancy: a long-term consequence of perinatal malnutrition in the rat. *Endocrinology*, 140: 4208-4213.
- Blüher M (2009) Adipose tissue dysfunction in obesity. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 117: 241-250.
- Blüher M (2012) Clinical relevance of adipokines. *Diabetes & Metabolism Journal*, 36: 317-327.
- Booth RFG, Patel TB, Clark JB (1980) The development of enzymes of energy metabolism in the brain of a precocial (guinea pig) and non-precocial (rat) species. *J Neurochem*, 34: 17-25.
- Borén J, Taskinen MR, Olofsson SO, Levin M (2013) Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship. *J Intern Med*, 274(1): 25-40.
- Bosco D, Fava A, Plastino M, Montalcini T, Pujia A (2011) Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Cell Mol Med*, 15: 1807-1821.
- Bourdeau A, Dubé N, Tremblay ML (2005) Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Curr Opin Cell Biol*, 17(2): 203-209.
- Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB (2004) Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science*, 304: 108-110.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Brandle M, Zhou H, Smith BR, Marriott D, Burke R, Tabaei BP, Brown MB, Herman WH (2003) The direct medical cost of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 26: 2300-2304.
- Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM (2004) Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*, 79: 537-543.

- Britton KA & Fox CS (2011) Ectopic fat depots and cardiovascular disease. *Circulation*, 124: e837-e841.
- Brown AM & Ransom BR (2007) Astrocyte and brain energy metabolism. *Glia*, 55: 1263-1271.
- Brown JL & Pollitt E (1996) Malnutrition, poverty and intellectual development. *Sci Am*, 274(2):38-43.
- Bucolo G and David H (1973) Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin Chem*, 19: 476-482.
- Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC (2007) High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, 15(4): 798-808.
- Burgos-Ramos E, Chowen JA, Arilla-Ferreiro E, Canelles S, Argente J, Barrios V (2011) Chronic central leptin infusion modifies the response to acute central insulin injection by reducing the interaction of the insulin receptor with IRS2 and increasing its association with SOCS3. *J Neurochem*, 117: 175-185.
- C** Cagdas DN, Pac FA, Cakal E (2008) Glucocorticoid-induced diabetic-ketoacidosis in acute rheumatic fever. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 13: 298-300.
- Cammisotto PG, Londono I, Gingras D, Bendayan M (2008) Control of glycogen synthase through ADIPOR-1-AMPK pathway in renal distal tubules of normal and diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294: F881-F889.
- Camprubí M, Ortega A, Balaguer A, Iglesias I, Girabent M, Callejo J, Figueras J & Krauel X (2009) Cauterization of Meso-ovarian Vessels, a New Model of Intrauterine Growth Restriction in Rats. *Placenta*, 30: 761-766.
- Carey M, Kehlenbrink S, Hawkins M (2013) Evidence for central regulation of glucose metabolism. *J Biol Chem*, 288(49): 34981-34988.
- Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Kodama K, Retzlaff BM, Brunzell JD, Shofer JB, Fish BE, Knopp RH, Kahn SE (2004) Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes*, 53(8): 2087-2094.
- Carvalho JB, Torsoni MA, Ueno M, Amaral ME, Araújo EP, Velloso LA, Gontijo JA, Saad MJ (2005) Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. *Obes Res*, 13: 48-5721.
- Chen J, Ishac EJ, Dent P, Kunos G, Gao B (1998) Effects of ethanol on mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase cascades in normal and regenerating liver. *Biochem J*, 334(3): 669-676.

- Chen LL, Hu X, Zheng J, Kong W, Zhang HH, Yang WH, Zhu SP, Zeng TS, Zhang JY, Deng XL, Hu D (2011) Lipid overaccumulation and drastic insulin resistance in adult catch-up growth rats induced by nutrition promotion after undernutrition. *Metabolism Clinical and Experimental*, 60: 569-578.
- Choi IY, Seaquist ER, Gruetter RJ (2003) Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism in vivo. *J Neurosci Res*, 72: 25-32.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Signal-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem*.162: 156 - 159.
- Chua SC, Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L (1996) Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*, 271: 994-996.
- Chung YH, Shin CM, Joo KM, Kim MJ, Cha CI (2002) Region-specific alterations in insulin-like growth factor receptor type I in the cerebral cortex and hippocampus of aged rats. *Brain Res*, 946: 307-313.
- Clodfelder-Miller B, De Sarno P, Zmijeweska AA, Song L, Jope RS (2005) Physiological and pathological changes in glucose regulate brain Akt and glycogen kinase synthase 3. *J Biol Chem*, 280: 39723-39731.
- Colombo G, Bazzo ML, Nogueira CL, Colombo MDHP, Schiavon LL, d'Acampora AJ (2012) A study on the short-term effect of cafeteria diet and pioglitazone on insulin resistance and serum levels of adiponectin and ghrelin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45: 935-941.
- Cotter DG, d'Avignon DA, Wentz AE, Weber ML, Crawford PA (2011) Obligatory role for ketone body oxidation in neonatal metabolic homeostasis. *J Biol Chem*, 286: 6902-6910.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411(6836): 480-484.
- Crace CJ, Swennea I, Milnera RDG (1989) Long-term follow-up after early protein-calorie malnutrition in young rats: Sex difference in glucose tolerance and serum insulin levels. *Metabolism*, 38(10): 933-938.
- Craft S (2007) Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment. *Curr Alzheimer Res*, 4: 147-152.
- Cremer JE, Braun LD, Oldendorf WH (1976) Changes during development in transport processes of the blood-brain barrier. *Biochim Biophys Acta*, 448: 633-637.

- Cristancho AG & Lazar MA (2011) Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 722-734.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378: 785-789.
- Cullingford T E, Dolphin CT, Bhakoo KK, Peuchen S, Canevari L, Clark JB (1998) Molecular cloning of rat mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase and detection of the corresponding mRNA and of those encoding the remaining enzymes comprising the ketogenic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA cycle in central nervous system of suckling rat. *Biochem J*, 329: 373-381.
- Culmsee C, Monnig J, Kemp BE, Mattson MP (2001) AMP-Activated Protein Kinase is Highly Expressed in Neurons in the Developing Rat Brain and Promotes Neuronal Survival Following Glucose Deprivation. *Journal of Molecular Neuroscience*, 17: 45-58.
- Currie PJ, Mirza A, Fuld R, Park D, Vasselli JR (2005) Ghrelin is an anorexigenic and metabolic signaling peptide in the arcuate and paraventricular nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289(2): R353-R358.
- D** de Rooij SR, Wouters H, Yonker JE, Painter RC, Roseboom TJ (2010) Prenatal undernutrition and cognitive function in late adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(39): 16881-16886.
- Dean DJ & Cartee GD (2000) Calorie restriction increases insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor and insulin receptor substrate-1 in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*, 169: 133-139.
- Dean DJ, Brozinick JT Jr, Cushman SW, Cartee GD (1998) Calorie restriction increases cell surface GLUT-4 in insulin-stimulated skeletal muscle. *Am J Physiol*, 275(6 Pt 1): E957-E964.
- DeFronzo RA, Ferrannini E, Sato Y, Felig P, Wahren J (1981) Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake. *J Clin Invest*, 68 (6): 1468-1474.
- Delahaye F, Breton C, Risold PY, Enache M, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Lesage J, Vieau D (2008) Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology*, 149(2): 470-475.

- Denver RJ, Bonett RM, Boorse GC (2011) Evolution of leptin structure and function. *Neuroendocrinology*, 94(1): 21-38.
- Desai M, Babu J, Ross MG (2007) Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293: R2306-R2314.
- Desai M, Gayle DA, Casillas E, Boles J, Ross MG (2009) Early undernutrition attenuates the inflammatory response in adult rat offspring. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 22(7): 571-575.
- Devaskar S, Zahm DS, Holtzclaw L, Chundu K, Wadzinski BE (1991) Developmental regulation of the distribution of rat brain insulin-insensitive (Glut 1) glucose transporter. *Endocrinol*, 129: 1530-1540.
- Djiane J & Attig L (2008) Role of leptin during perinatal metabolic programming and obesity. *J Physiol Pharmacol*, 59 (Suppl 1): 55-63.
- Donohoe CL, Doyle SL, Reynolds JV (2011) Visceral adiposity, insulin resistance and cancer risk. *Diabetol Metab Syndr*, 3: 12. doi: 10.1186/1758-5996-3-12.
- Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N (2010) Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, 1804(3): 433-439.
- Dringen R, Gebhardt R, Hamprecht B (1993) Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighbouring cells. *Brain Res*, 623: 208-214.
- Druce MR, Small CK, Bloom SR (2004) Minireview: Gut peptides regulating satiety. *Endocrinology*, 145: 2660-2665.

**E**

- Elgee NJ, Williams RH, Lee ND (1954) Distribution and degradation studies with insulin-I131. *J Clin Invest*, 33: 1252-1260.
- El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjørbæk C, Flier JS (2000) Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest*, 105(12): 1827-1832.
- Escrivá F, Rodríguez C, Cacho J, Álvarez C, Portha B, Pascual-Leone AM (1992) Glucose utilization and insulin action in adult rats submitted to prolonged food restriction. *Am J Physiol*, 263(1Pt1): E1-E7.
- Estrany ME, Proenza AM, Lladó I, Gianotti M (2011) Isocaloric intake of a high-fat diet modifies adiposity and lipid handling in a sex dependent manner in rats. *Lipids Health Dis*, 10:52. doi: 10.1186/1476-511X-10-52.

## F

- Fainberg HP, Sharkey D, Sebert S, Wilson V, Pope M, Budge H, Symonds ME (2013) Suboptimal maternal nutrition during early fetal kidney development specifically promotes renal lipid accumulation following juvenile obesity in the offspring. *Reprod Fertil Dev*, 25(5): 728-736.
- Falcou R, Bouillaud F, Mory G, Apfelbaum M, Ricquier D (1985) Increase of uncoupling protein and its mRNA in brown adipose tissue of rats fed on 'cafeteria diet'. *Biochem. J*, 231: 241-244.
- FAO: Informe SOFI (9 Octubre, 2012; Roma)  
<http://www.fao.org/news/story/es/item/161867/icode/>
- FAOSTAT 2010 ([www.fao.org/hunger/es](http://www.fao.org/hunger/es))  
[http://www.fao.org/fileadmin/templates/es/Hunger\\_Portal/Hunger\\_Map-es.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/es/Hunger_Portal/Hunger_Map-es.pdf)
- Farese RV & Sajan MP (2010) Metabolic functions of atypical protein kinase C: "good" and "bad" as defined by nutritional status. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298(3): E385-E394.
- Farese RV (2002) Function and dysfunction of a PKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283(1): E1-E11.
- Feillet F, Feillet-Coudray C, Bard JM, Parra HJ, Favre E, Kabuth B, Fruchart JC, Vidailhet M (2000) Plasma cholesterol and endogenous cholesterol synthesis during refeeding in anorexia nervosa. *Clinica Chimica Acta*, 294: 45-56.
- Feng B, Zhang T, Xu H (2013) Human adipose dynamics and metabolic health. *Ann NY Acad Sci*, 1281: 160-177.
- Fernández E, Martín MA, Fajardo S, Bailbé D, Gangnerau MN, Portha B, Escrivá F, Serradas P, Álvarez C (2006) Undernutrition does not alter the activation of  $\beta$ -cell neogenesis and replication in adult rats after partial pancreatectomy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291: E913-E921.
- Fernández-Twinn DS & Ozanne E (2010) Early life nutrition and metabolic programming. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Issue: The Year in Diabetes and Obesity.
- Figlewicz DP (2004) Intraventricular insulin and leptin reverse place preference conditioned with high-fat diet in rats. *Behav Neurosci*, 118: 479-487.
- Figlewicz DP, Sipols AJ, Seeley RJ, Chaves M, Woods SC, Porte D (1995) Intraventricular insulin enhances the meal-suppressive efficacy of intraventricular cholecystokinin octapeptide in the baboon. *Behav Neurosci*, 109: 567-569.

- Fisler JS, Shimizu H, Bray GA (1989) Brain 3-hydroxybutyrate, glutamate, and GABA in a rat model of dietary obesity. *Physiol Behav*, 45: 571-577.
- Flores MB, Fernandes MF, Ropelle ER, Faria MC, Ueno M, Velloso LA, Saad MJ, Carnevali JB (2006) Exercise improves insulin and leptin sensitivity in hypothalamus of Wistar rats. *Diabetes*, 55(9): 2554-2561.
- Ford SP, Hess BW, Schwobe MM, Nijland MJ, Gilbert JS, Vonnahme KA, Means WJ, Han H, Nathanielsz PW (2007) Maternal undernutrition during early to mid-gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in male offspring. *Journal of Animal Science*, 85(5): 1285-1294.
- Forrester TE, Badaloo AV, Boyne MS, Osmond C, Thompson D, Green C, Taylor-Bryan C, Barnett A, Soares-Wynter S, Hanson MA, Beedle AS, Gluckman PD (2012) Prenatal Factors Contribute to the Emergence of Kwashiorkor or Marasmus in Severe Undernutrition: Evidence for the Predictive Adaptation Model. *PLoS One*, 7(4): e35907. doi: 10.1371/journal.pone.0035907
- Forshee RA, Storey ML, Allison DB, Glinsmann WH, Hein GL, Lineback DR, Miller SA, Nicklas TA, Weaver GA, White JS (2007) A Critical Examination of the Evidence Relating High Fructose Corn Syrup and Weight Gain. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47: 561-582.
- Fujita N, Katu K, Okubo M, Nagasaka Y, Kaneko T (1996) Insulin stimulates protein synthesis of glycogen synthase in rat hepatoma H4 cells associated with acceleration of translation rate. *Endocr J*, 43: 313-320.

## G

- Gamallo JL, Perry ML, Trindade VM, Pereira IR, Bernard EA (1989) Effect of pre- and postnatal protein undernutrition on glycemia, ketonemia and liver glycogen concentration in suckling rats. *Ann Nutr Metab*, 33: 266-270.
- García A, Cayla X, Guergnon J, Dessauge F, Hospital U, Rebollo MP, Fleischer A, Rebollo A (2003) Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2 are key players in apoptosis. *Biochimie*, 85: 721-726.
- García AP, Palou M, Priego T, Sánchez J, Palou A, Picó C (2010) Moderate caloric restriction during gestation results in lower arcuate nucleus NPY- and alphaMSH-neurons and impairs hypothalamic response to fed/fasting conditions in weaned rats. *Diabetes Obes Metab*, 12(5): 403-413.

- Garofano A, Czernichow P, Breant B (1999) Effect of ageing on beta cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period. *Diabetologia*, 42: 711-718.
- Gat-Yablonski G, Pando R, Phillip M (2013) Nutritional catch-up growth. *World Rev Nutr Diet*, 106: 83-89.
- Gavete ML, Agote M, Martin MA, Alvarez C, Escriva F (2002) Effects of chronic undernutrition on glucose uptake and glucose transporter proteins in rat heart. *Endocrinology*, 143(11): 4295-4303.
- Gehart H, Kumpf S, Ittner A, Ricci R (2010) MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness? *EMBO reports*, 11(11): 834-840.
- Gerich JE (2000) Physiology of glucose homeostasis. *Diabetes Obes Metab*, 2: 345-350.
- Ghilardi N & Skoda RC (1997) The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol Endocrinol*, 11: 393-399.
- Gibbs ME, Anderson DG, Hertz L (2006) Inhibition of glycogenolysis in astrocytes interrupts memory consolidation in young chicken. *Glia*, 54: 214-222.
- Gibbs ME, Lloyd HG, Santa T, Hertz L (2007) Glycogen is a preferred glutamate precursor during learning in 1-day old chick: biochemical and behavioural evidence. *J Neurosci Res*, 85: 3326-3333.
- Godfrey KM (2002) The role of the placenta in fetal programming - a review. *Placenta*, 23(Suppl A): S20-S27.
- Gosby AK, Maloney CA, Caterson ID (2010) Elevated insulin sensitivity in low-protein offspring rats is prevented by a high-fat diet and is associated with visceral fat. *Obesity (Silver Spring)*, 18: 1593-1600.
- Gosby AK, Maloney CA, Phuyal JL, Denyer GS, Bryson JM, Caterson ID (2003) Maternal protein restriction increases hepatic glycogen storage in young rats. *Pediatr Res*, 54: 413-418.
- Gosnell BA, Levine AS, Morley JE (1986) The stimulation of food intake by selective agonists of mu, kappa and delta opioid receptors. *Life Sci*, 38: 1081-1088.
- Grace CJ, Swenne I, Kohn PG, Strain AJ, Milner RD (1990) Protein-energy malnutrition induces changes in insulin sensitivity. *Diabete Metab*, 16(6): 484-491.
- Graham MR, Evans P, Davies B, Baker JS (2008) AAs, growth hormone and insulin abuse: psychological and neuroendocrine effects. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4(3): 587-597.

- Granton PV, Norley CJD, Umoh J, Turley EA, Frier BC, Noble EG, Holdsworth DW (2010) Rapid in vivo whole-body composition of rats using cone-beam micro-CT. *J Appl Physiol*, 109(4):1162-1169
- Grimes CA & Jope RS (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol*, 65: 391-426.
- Gu Y, Lindner J, Kumar A, Yuan W, Magnuson MA. Rictor/mTORC2 is essential for maintaining a balance between beta-cell proliferation and cell size. (2011) *Diabetes*, 60(3): 827-837.
- H** Haddad JJ (2005) N-methyl-D-aspartate (NMDA) and the regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways: a revolving neurochemical axis for therapeutic intervention? *Prog Neurobiol*, 77(4): 252-282.
- Hahn P & Taller M (1987) Ketone formation in the intestinal mucosa of infant rats. *Life Sci*, 41: 1525-1528.
- Hales CN & Barker DJP (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35: 595-601.
- Hales CN & Barker DJP (2001) The thrifty phenotype hypothesis. *Br. Med. Bull*, 60: 5-20.
- Hales CN & Ozanne SE (2003) The dangerous road of catch-up growth. *Journal of Physiology*, 547(1): 5-10.
- Halestrap AP (2012) The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life*, 64(1): 1-9.
- Harder T, Rodekamp E, Schellong K, Dudenhausen JW, Plagemann A (2007) Birth Weight and Subsequent Risk of Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis. *Am J Epidemiol*, 165: 849-857.
- Haugaard N, Vaughan M, Haugaard ES, Stadie WC (1954) Studies of radioactive injected labeled insulin. *J Biol Chem*, 208: 549-563.
- Havrankova J, Roth J, Brownstein M (1978) Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*, 272: 827-829.
- Hawkins RA, Williamson DH, Krebs HA (1971) Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. *Biochem J*, 122: 13-18.
- He ZX, Sun ZH, Tan ZL, Tang SX, Zhou CS, Han XF, Wang M, Wu DQ, Kang JH, Beauchemin KA (2012) Effects of maternal protein or energy restriction during late gestation on antioxidant status of plasma and immune tissues in postnatal goats. *J Anim Sci*, 90: 4319-4326.

- Heard CRC & Phil D (1966) The effects of severe protein-calorie deficiency on the endocrine control of carbohydrate metabolism. *Diabetes*, 15: 78-79.
- Hegardt FG (1999) Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochem J*, 338: 569-582.
- Hertz L, Peng L, Dienel GA (2007) Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatio temporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *J Cereb Flow Metab*, 27: 219-249.
- Hotamisligil GS & Spiegelman BM (1994) Tumornecrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*, 43: 1271-1278.
- Hotamisligil GS (2010) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, 140: 900-917.
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM (1996) IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity induced insulin resistance. *Science*, 271: 665-668.
- Huang C, Phillips MR, Zhang Y, Zhang J, Shi Q, Song Z, Ding Z, Pang S, Martorell R (2012) Malnutrition in early life and adult mental health: Evidence from a natural experiment. *Social Science & Medicine*, 30: 1-8.
- Huang CC, Lee CC, Kuei-Sen H (2010) The Role of Insulin Receptor Signaling in Synaptic Plasticity and Cognitive Function. *Chang Gung Med J*, 33(2): 115-125.
- Hulshoff Pol HE, Hoek HW, Susser E, Brown AS, Dingemans A, Schnack HG, van Haren NE, Pereira Ramos LM, Gispen-de Wied CC, Kahn RS (2000) Prenatal exposure to famine and brain morphology in schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 157(7): 1170-1172.
- I** Imada K & Leonard WJ (2000) The Jak-STAT pathway. *Molecular Immunology*, 37: 1-11.
- Ishikawa M & Koga K (1998). Measurement of abdominal fat by magnetic resonance imaging of OLETF rats, an animal model of NIDDM. *Magnetic Resonance Imaging*, 16(1): 45-53.
- Ivanovic DM, Leiva BP, Perez HT, Almagia AF, Toro TD, Urrutia M, Inzunza NB and Bosch EO (2002) Nutritional status, brain development and scholastic achievement of children high-school graduates from high and low intellectual quotient and socio-economic status. *Br. J. Nutr*, 87: 82-92.

## J

- Jackson VN, Price NT, Carpenter L, Halestrap AP (1997) Cloning of the monocarboxylate transporter isoform MCT2 from rat testis provides evidence that expression in tissues is species-specific and may involve post-transcriptional regulation. *Biochem J*, 324 (Pt2): 447-453.
- Jee YH, Baron J, Phillip M, Bhutta ZA (2014) Malnutrition and catch-up growth during childhood and puberty. *World Rev Nutr Diet*, 109: 89-100. doi: 10.1159/000356109.
- Jelinek LJ, Lok S, Rosenberg GB, Smith RA, Grant FJ, Biggs S, Bensch PA, Kuijper JL, Sheppard PO, Sprecher CA, O'Hara PJ, Foster D, Walker KM, Chen LHJ, Mckernan PA, Kindsvogel W (1993) Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science*, 259: 1614-1616.
- Jiang G & Zhang B (2003) Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284: E671-E678.
- Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E (2007) Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3): inflammation, diseases and therapeutics. *Neurochem Res*, 32: 577-595.
- Joshi SR, Mohan V, Joshi SS, Mechanick JI, Marchetti A (2012) Transcultural Diabetes Nutrition Therapy Algorithm: The Asian Indian Application. *Curr Diab Rep*, 12: 204-212.

## K

- Kajihara H, Tsutsumi E, Kinoshita A, Nakano J, Takagi K, Takeo S (2001) Activated astrocytes with glycogen accumulation in ischemic penumbra during the early stage of brain infarction: immunohistochemical and electron microscopic studies. *Brain Res*, 909: 92-101.
- Kaneki M, Shimizu N, Yamada D, Chang K (2007) Nitrosative stress and pathogenesis of insulin resistance. *Antioxid Redox Signal*, 9(3): 319-329.
- Kelleher CC, Lynch J, Harper S, Nolan G (2004) Hurling Alone? How Social Capital Failed to Save the Irish From Cardiovascular Disease in the United States. *American Journal of Public Health*, 94(12): 2162-2169.
- Kieffer TJ & Habener JF (1999) The glucagon-like peptides. *Endocr Rev*, 20: 876-913.
- Kim EK, Miller I, Aja S, Landree LE, Pinn M, McFadden J, Kuhajda FP, Moran TH, Ronnet GV (2004) C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMPK-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 279: 19970-19976.
- Kimball SR, Siegfried BA, Jefferson LS (2004) Glucagon represses signaling through the mammalian target of rapamycin in rat liver by activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 279: 54103-54109.

- Kirchgessner AL (2002) Orexins in the brain-gut axis. *Endocrinol Rev*, 23: 1-15.
- Kirk SL, Samuelsson AM, Argenton M, Dhonye H, Kalamatianos T, Poston L, Taylor PD, Coen CW (2009) Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS One*, 4(6): e5870. doi: 10.1371/journal.pone.0005870.
- Kitamura M (2013) The unfolded protein response triggered by environmental factors. *Semin Immunopathol*, 35(3): 259-275.
- Kleman AM, Yuan JY, Aja S, Ronnet GV, Landree LE (2008) Physiological glucose is critical for optimized neuronal viability and AMPK responsiveness in vitro. *J Neurosci Methods*, 167: 292-301.
- Kong J, Shepel N, Holden CP, Mackiewicz, Pack AI, Geiger JD (2002). Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. *J Neurosci*, 22(13): 5581-5587.
- König B, Koch A, Giggel K, Dordschbal B, Eder K, Stangl GI (2008) Monocarboxylate transporter (MCT)-1 is up-regulated by PPARalpha. *Biochim Biophys Acta*, 1780: 899-904.
- Könner AC & Brüning JC (2012) Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab*, 16(2): 144-52.
- Konturek PC, Konturek SJ, Ochmanski W (2004) Endocrinology of gastric H<sup>+</sup> and duodenal HCO<sub>3</sub> secretion the role of brain-gut axis. *Eur J Pharmacol*, 499: 15-27.
- Konturek SJ, Pepera J, Zabielski K, Konturek PC, Pawlik T, Szlachcic A, Hahn EG (2003) Brain-gut axis in pancreatic secretion and appetite control. *J Physiol Pharmacol*, 54: 293-317.
- Koo SH, Flechner L, Qi L, Zhang X, Sreaton RA, Jeffries S, Hedrick S, Xu W, Boussouar F, Brindle P, Takemori H, Montminy M (2005) The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature*, 437: 1109-1111.
- Koren S & Fantus IG (2007) Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 21(4): 621-640.
- Kumarasamy V, Mitchell MD, Bloomfield FH, Oliver MT, Campbell ME, Challis JRG (2005) Effects of periconceptual undernutrition on the initiation of parturition in sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288: R67-R72.

- L**aeuger T, Metges CC, Kuhla B (2010) Role of beta-hydroxybutyric acid in the central regulation of energy balance. *Appetite*, 54: 450-455.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(259): 680-685.
- Laffel L (1999) Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 15: 412-426.
- Lalanza JF, Caimari A, del Bas JM, Torregrosa D, Cigarroa I, Pallàs M, Capdevila L, Arola L, Escorihuela RM (2014) Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour. *PLoS One*, 9(1):e85049. doi: 10.1371/journal.pone.0085049.
- Laus MF, Vales LD, Costa TM, Almeida SS (2011) Early postnatal proteincalorie malnutrition and cognition: a review of human and animal studies. *Int J Environ Res Public Health*, 8: 590-612.
- Laviola L, Belsanti G, Davalli AM, Napoli R, Perrini S, Weir GC, Giorgino R, Giorgino F (2001) Effects of streptozocin diabetes and diabetes treatment by islet transplantation on in vivo insulin signaling in rat heart *Diabetes*, 50(12): 2709-2720.
- Lee MO (1929) Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. *Am J Physiol*, 89: 24-33.
- Leino RL, Gerhart DZ, Duelli R, Enerson BE, Drewes LR (2001) Diet induced ketosis increases monocarboxylate transporter (MCT1) levels in rat brain. *Neurochem Int*, 38: 519-527.
- Leino RL, Gerhart, DZ, Drewes LR (1999) Monocarboxylate transporter (MCT1) abundance in brains of suckling and adult rats: a quantitative electron microscopic immunogold study. *Dev Brain Res*, 113: 47-54.
- Leong S & Clark J (1984) Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem J*, 218: 131-138.
- Levobitz HE & Banerji MA (2005) Point: Visceral Adiposity is causally related to Insulin Resistance. *Diabetes Care*, 28(9): 2322-2325.
- Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C (1993) Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med*, 329: 1988-1992.

- Liu J & Raine A (2006) The effect of childhood malnutrition on externalizing behaviour. *Curr Opin Pediat*, 18: 565-570.
- Liu X, Qi Y, Gao H, Jiao Y, Gu H, Miao J, Yuan Z (2013) Maternal protein restriction induces alterations in insulin signaling and ATP sensitive potassium channel protein in hypothalami of intrauterine growth restriction fetal rats. *J Clin Biochem Nutr*, 52(1): 43-48.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. *Methods*, 25: 402-408.
- M** Maalouf M, Rho JM, Mattson MP (2009) The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. *Brain Res. Rev*, 59: 293-315.
- Malamitsi-Puchner A, Nikolaou KE, Puchner KP (2006) Intrauterine Growth Restriction Brain-Sparing Effect, and Neurotrophins. *Ann NY Acad Sci*, 1092: 293-296.
- Martín MA, Alvarez C, Goya L, Portha B, and Pascual-Leone AM (1997) Insulin secretion in adult rats that had experienced different underfeeding patterns during their development. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 272: E634-E640.
- Martín MA, Fernández E, Pascual-Leone AM, Escrivá F, Álvarez C (2004) Protein calorie restriction has opposite effects on glucose metabolism and insulin gene expression in fetal and adult rat endocrine pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286(4): E542-E550.
- Martins PA, Hoffman DJ, Fernandes MT, Nascimento CR, Roberts SB, Sesso R, Sawaya AL (2004) Stunted children gain less lean body mass and more fat mass than their non-stunted counterparts: a prospective study. *Br J Nutr*, 92: 819-825.
- Martire SI, Holmes N, Westbrook RF, Morris MJ (2013) Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet: increased snacking and its implications for development of obesity. *PLoS One*, 8(4): e60407. doi: 10.1371/journal.pone.0060407.
- Marton T, Hargitai B, Bowen C, Cox PM (2013) Elevated brain weight/liver weight ratio in normal body weight centile term perinatal deaths: an indicator of terminal intrauterine malnourishment. *Pediatr Dev Pathol*, 16(4): 267-271.
- Mascaró C, Acosta ME, Hegardt FG, Haro D (1998) Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem*, 273: 8560-8563.

- Matsuda J, Yokota I, Iida M, Murakami T, Yamada M, Saijo T, Naito E, Ito M, Shima K, Kuroda Y (1999) Dynamic changes in serum leptin concentrations during the fetal and neonatal periods. *Pediatr Res*, 45(1): 71-75.
- Maurovich-Horvat P, Massaro J, Fox CS, Moselewski F, O'Donnell CJ and Hoffmann U (2007) Comparison of anthropometric, area and volume based assessment of abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue volumes using multi-detector computed tomography. *International Journal of Obesity*, 31: 500-506.
- McConnell GK, Rattigan S, Lee-Young RS, Wadley GD, Merry TL (2012) Skeletal muscle nitric oxide signaling and exercise: a focus on glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 303(3): E301-E307.
- McEwen BS & Reagan LP (2004) Glucose transporter expression in the central nervous system: Relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol*, 490: 13-24.
- McGarry JD & Foster DW (1980) Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem*, 49: 395-420.
- McGarry JD, Woeltje KF, Kuwajima M, Foster DW (1989) Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes Metab Rev*, 5(3): 271-284.
- McQuaid SE, Hodson L, Neville MJ, Dennis AL, Cheeseman J, Humphreys SM, Ruge T, Gilbert M, Fielding BA, Frayn KN, Karpe F (2011) Downregulation of Adipose Tissue Fatty Acid Trafficking in Obesity: A Driver for Ectopic Fat Deposition? *Diabetes*, 60(1): 47-55.
- Mendi M (1988) The effects of litter size variation on mother-offspring relationships and behavioural and physical development in several mammalian species (principally rodents). *Journal of Zoology*, 215(1): 15-34.
- Merezhinskaya N & Fishbein WN (2009) Monocarboxylate transporters: past, present and future. *Histol Histopathol*, 24: 243-264.
- Misra A & Garg A (2003) Clinical features and metabolic derangements in acquired generalized lipodystrophy: case reports and review of the literature. *Medicine*, 82: 129-146.
- Misra A & Khurana L (2008) Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(11S1): S9-S30.
- Monk C, Georgieff MK, Osterholm EA (2013) Research review: maternal prenatal distress and poor nutrition - mutually influencing risk factors affecting infant neurocognitive development. *J Child Psychol Psychiatry*, 54(2): 115-130.

- Morikawa Y, Ueyama E, Senba E (2004) Fasting-induced activation of mitogen-activated protein kinases (ERK/p38) in the mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, 16(2): 105-112.
- Morris AA (2005) Cerebral ketone body metabolism. *J Inherit Metab Dis*, 28: 109-121.
- Mukherjee P, Mulrooney TJ, Marsh J, Blair D, Chiles TC, Seyfried TN (2008) Differential effects of energy stress on AMPK phosphorylation and apoptosis in experimental brain tumor and normal brain. *Mol Cancer*, 7: 37-51.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116(1): 201-211.
- Munzberg H & Myers MG (2005) Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci*, 8: 566-570.
- Munzberg H, Flier JS, Bjørbæk C (2004) Region-Specific Leptin Resistance within the Hypothalamus of Diet-Induced Obese Mice. *Endocrinology*, 145(11): 4880-4889.
- N** Neel JV (1962) Diabetes mellitus: a thrifty genotype rendered detrimental by progress? *Am J Hum Genet*, 14: 353-362.
- Neelsen S & Stratmann T (2011) Effects of prenatal and early life malnutrition: Evidence from the Greek famine. *Journal of Health Economics*, 30: 479-488.
- Nehlig A, de Vasconcelos AP, Boyet S (1987) Quantitative auto radiographic measurement of local cerebral glucose utilization in freely moving rats during postnatal development. *J Neurosci*, 8: 2321-2333.
- Nelson TJ, Sun MK, Hongpaisan J, Alkon DL (2008) Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair. *Eur J Pharmacol*, 585: 76-87.
- Nielsen MO, Kongsted AH, Thygesen MP, Strathe AB, Caddy S, Quistorff B, Jørgensen W, Christensen VG, Husted S, Chwalibog A, Sejrsen K, Purup S, Svalastoga E, McEvoy FJ, Johnsen L (2013) Late gestation undernutrition can predispose for visceral adiposity by altering fat distribution patterns and increasing the preference for a high-fat diet in early postnatal life. *Br J Nutr*, 109(11): 2098-2110.
- Nikitina L, Dorofeeva N, Kirillova O, Korotkov A, Glazova M, Chernigovskaya E (2013) Role of the ERK signaling pathway in regulating vasopressin secretion in dehydrated rats. *Biotech Histochem*. doi: 10.3109/10520295.2013.832799.

## O

Ogier V, Ziegler O, Mejean L, Nicolas JP, Stricker-Kongrad A (2002) Obesity is associated with decreasing levels of the circulating soluble leptin receptor in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26: 496-503.

Okitolonda W, Brichard SM, Henquin JC (1987) Repercussions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat. *Diabetologia*, 30(12): 946-951.

Oldendorf WH (1971) Brain uptake of radio-labelled amino acids, amines and hexoses after arterial injection. *Am J Physiol*, 221: 1629-1639.

Ong KKL, Ahmed ML, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB (2000) Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *Br Med J*, 320: 967-971.

Ono H (2009) The hypothalamus bridges the gap between physiology and biochemistry in high-fat diet-induced hepatic insulin resistance. *Cell Cycle*, 8(18): 2885-2887.

Otsu N (1979) A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE transactions on systems, man and cybernetics*, SMC-9,1.

Ozanne SE, Nave BT, Wang CL, Shepherd PR, Prins J, Smith GD (1997) Poor fetal nutrition causes long-term changes in expression of insulin signaling components in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 273: E46-E51.

Ozanne SE, Smith GD, Tikerpae J, Hales CN (1996) Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams. *Am J Physiol*, 270: E559-E564.

## P

Partridge WM (1988) Recent advances in blood-brain barrier transport. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 28: 25-39.

Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, Rood JC, Burk DH, Smith SR (2009) Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes*, 58: 718-725.

Paxinos G & Watson C (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Compact 3<sup>rd</sup> ed., Academic Press, San Diego.

Peeling AN & Smart JL (1994) Review of literature showing that undernutrition affects the growth of all processes in the brain to the same extent. *Metab Brain Dis*, 9: 33-42.

- Pellerin L, Bergersen LH, Halestrap AP, Pierre K (2005) Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain. *J Neurosci Res*, 79: 55-64.
- Phelps CH (1972) Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain. An electron microscopic study. *Brain Res*, 39: 225-234.
- Pietrabissa G, Manzoni GM, Corti S, Vegliante N, Molinari E, Castelnuovo G (2012) Addressing motivation in globesity treatment: a new challenge for clinical psychology. *Frontiers in Psychology*, 3(317): 1-4.
- Plagemann A, Harder T, Rake A, Melchior K, Rhode W, Dörner G (2000a) Hypothalamic nuclei are malformed in weaning offspring of low protein malnourished rats. *J Nutr*, 130: 2582-2590.
- Plagemann A, Waas T, Harder T, Rittel F, Ziska T, Rohde W (2000b) Hypothalamic neuropeptide Y levels in weaning offspring of low-protein malnourished mother rats. *Neuropeptides*, 34(1): 1-6.
- Plum L, Belgardt BF, Brüning JC (2006) Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest*, 116(7): 1761-1766.
- Polekhina G, Gupta A, Michell BJ, van Denderen B, Murthy S, Feil SC, Jennings IG, Campbell DJ, Witters LA, Parker MW, Kemp BE, Stapleton D (2003) AMPK beta subunit target metabolic stress sensing to glycogen. *Curr Biol*, 13(10): 867-871.
- Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Höer NF, Boschero AC, Saad MJ (2005) Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology*, 146(3): 1576-1587.
- Prins ML (2008) Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28(1): 1-16.
- Pruis MG, van Ewijk PA, Schrauwen-Hinderling VB, Plösch T (2013) Lipotoxicity and the role of maternal nutrition. *Acta Physiol (Oxf)*. doi: 10.1111/apha.12171.
- R** Rajia S, Chen H, Morris MJ (2010) Maternal overnutrition impacts offspring adiposity and brain appetite markers-modulation by postweaning diet. *J Neuroendocrinol*, 22(8): 905-914.
- Ravelli ACJ, van Der Meulen JHP, Osmond C, Barker DJP, Bleker OP (1999) Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(5): 811-816.

- Ren RX & Shen Y (2010) A meta-analysis of relationship between birth weight and cord blood leptin levels in newborns. *World J Pediatr*, 6 : 311-316.
- Rickwood D, Wilson MT, Darley-Usmar UM (1987) *Mitochondria: a practical approach*. London, IRL Press, 1-16.
- Robinet C & Pellerin L (2010) Brain-derived neurotrophic factor enhances the expression of the monocarboxylate transporter 2 through translational activation in mouse cultured cortical neurons. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30: 286-298.
- Robinson AM & Williamson DH (1980) Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev*, 60(1): 143-187.
- Rodríguez A, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G (2007) Visceral and subcutaneous adiposity: are both potential therapeutic targets for tackling the metabolic síndrome? *Curr Pharm Des*, 13(21): 169-175.
- Rodríguez E, Ribot J, Rodriguez AM, Palou A (2004) PPAR-gamma2 expression in response to cafeteria diet: gender- and depot-specific effects. *Obes Res*, 12: 1455-1463.
- Rodríguez JC, Gil-Gómez G, Hegardt FG, Haro D (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem*, 269: 18767-18772.
- Romero M, Roy S, Pouillot K, Feito M, Esteve M, Grasa M, Fernández-López JA, Alemany M, Remesar X (2014) Treatment of Rats with a Self-Selected Hyperlipidic Diet, Increases the Lipid Content of the Main Adipose Tissue Sites in a Proportion Similar to That of the Lipids in the Rest of Organs and Tissues. *PLoS One*, 9(3). doi: 10.1371/journal.pone.0090995.
- Romijn HJ, Hofman MA, Gramsbergen A (1991) At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum Dev*, 26: 61-67.
- Rong-Ying Li, Xue-Song Li, Li Shao, Zhi-yuan Wu, Wen-Hua Du, Sheng-Xian Li, Shuang-xia Zhao, Ke-min Chen, Ming-Dao Chen, Huai-Dong Song (2009) Influence of visceral adiposity on ghrelin secretion and expression in rats during fasting. *Journal of Molecular Endocrinology*, 42: 67-74.
- Roseboom T, de Rooij S, Painter R (2006) The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev*, 82: 485-491.
- Rosenbloom AL, Joe JR, Young RS, Winter WE (1999) Emerging epidemic of Type 2 Diabetes in Youth. *Diabetes Care*, 22: 345-354.

- Ross MG & Desai M (2005) Gestational programming: population survival effects of drought and famine during pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288: R25–R33.
- Rothwell NJ & Stock MJ (1979) Combined effects of cafeteria and tube-feeding on energy balance in the rat. *Proc Nutr Soc*, 38: 5A.
- Rotta LN, Schmidt AP, Mello e Souza T, Noqueir CW, Souza KB, Izquierdo IA, Parry ML, Souza DO (2003) Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. *Neurochem Res*, 28: 1181–1186.
- Rotter V, Nagaev I, Smith U (2003) Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J. Biol. Chem*, 278: 45777–45784.
- Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF (2002) SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem*, 277(44): 42394–42398.
- S** Sahu A (2003) Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol*, 24: 225–253.
- Sajan MP, Standaert ML, Miura A, Bandyopadhyay G, Vollenweider P, Franklin DM, Lea-Currie R, Farese RV (2004) Impaired activation of protein kinase C-zeta by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO4)<sub>3</sub> in cultured preadipocyte-derived adipocytes and myotubes of obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(8): 3994–3998.
- Saltiel AR & Kahn R (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414: 799–806.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring: Harbor Laboratory Press.
- Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L (2011) Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity*, 19(6): 1109–1117.
- Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI (2004) Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*, 279(31): 32345–32353.

- Sánchez J, Oliver P, Miralles O, Ceresi E, Picó C, Palou A (2005) Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding. *Endocrinology*, 146(6): 2575-2582.
- Sánchez-Lozada LG, Mu W, Roncal C, Sautin YY, Abdelmalek M, Reungjui S, Le M, Nakagawa T, Lan HY, Yu X, Johnson RJ (2010) Comparison of free fructose and glucose to sucrose in the ability to cause fatty liver. *Eur J Nutr*, 49(1): 1-9.
- Santi SA & Lee H (2010) The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298(3): C580-591.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307(5712): 1098-1101.
- Sardinha FL, Telles MM, Albuquerque KT, Oyama LM, Guimarães PA, Santos OF, Ribeiro EB (2006) Gender difference in the effect of intrauterine malnutrition on the central anorexigenic action of insulin in adult rats. *Nutrition*, 22(11-12): 1152-1161.
- Sartipy P & Loskutoff DJ (2003) Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 7265-7270.
- Savastano DM & Covasa M (2005) Adaptation to a high-fat diet leads to hyperphagia and diminished sensitivity to cholecystokinin in rats. *J Nutr*, 135(8): 1953-1959.
- Schaffer JE (2003) Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol*, 14(3): 281-287.
- Schlabritz-Loutsevitch N, Ballesteros B, Dudley C, Jenkins S, Hubbard G, Burton GJ, Nathanielsz P (2007) Moderate Maternal Nutrient Restriction, but not Glucocorticoid Administration, Leads to Placental Morphological Changes in the Baboon (*Papio sp.*). *Placenta*, 28: 783-793
- Schrauwen-Hinderling VB, Schrauwen P, Hesselink MK, van Engelshoven JM, Nicolay K, Saris WH, Kessels AG, Kooi ME (2003) The increase in intramyocellular lipid content is a very early response to training. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(4): 1610-1616.
- Schulz LC (2010) The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. *PNAS*, 107(39): 16757-16758.
- Schuz PW, Wong PK, O'Kusky J, Innis SM, Stockler S (2011) Effects of D-3-hydroxybutyrate treatment on hypoglycaemic coma in rat pups. *Exp Neurol*, 227: 180-187.
- Schwartz GJ, Whitney A, Skoglund C, Castonguay TW, Moran TH (1999) Decreased responsiveness to dietary fat in Osuka Long-Evans Tokushima fatty rats lacking CCK-A receptors. *Am J Physiol*, 277: R1144-1151.

- Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D (1992) Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev*, 13: 387-414.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404: 661-671.
- Sclafani A & Springer D (1976) Dietary obesity in adult rats: Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiology & Behavior*, 17(3): 461-471.
- Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA (2002) Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes*, 51(12): 3391-3399.
- Shen W, Wang Z, Tang H, Heshka S, Punyanitya M, Zhu S, Lei J, Heymsfield SB (2003) Volume estimates by imaging methods: model comparisons with visible woman as the reference. *Obes Res*, 11: 217-25.
- Shi H, Tzameli I, Bjørbæk C, Flier JS (2004) Suppressor of cytokine signaling 3 is a physiological regulator of adipocyte insulin signaling. *J Biol Chem*, 279(33): 34733-34740.
- Sickmann HM, Walls AB, Schousboe A, Bouman SD, Waagepetersen HS (2009) Functional significance of brain glycogen in sustaining glutamatergic neurotransmission. *J Neurochem*, 109: 80-86.
- Siri WE (1961) Body composition from fluid spaces and density analysis of methods. In: Brozek, J.; Henschel, A., editors. *Techniques for Measuring Body Composition*. National Academy of Sciences / National Research Council; Washington, DC. p. 223-244.
- Snel M, Jonker JT, Schoones, Lamb H, de Roos A, Pijl H, Smit JWA, Meinders AE, Jazet IM (2012) Ectopic fat and insulin resistance: pathophysiology and effect of diet and lifestyle interventions. *Int J Endocrinol*: 983814. doi: 10.1155/2012/983814.
- Spaniol M, Kaufmann P, Beier K, Wüthrich J, Török M, Scharnagl H, März W, Krähenbühl S (2003) Mechanisms of liver steatosis in rats with systemic carnitine deficiency due to treatment with trimethylhydraziniumpropionate. *J Lipid Res*, 44(1): 144-53.
- Srinivasan M, Mahmood S, Patel MS (2013) Metabolic programming effects initiated in the suckling period predisposing for adult-onset obesity cannot be reversed by calorie restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 304(5): E486-E494.

- St Clair D, Xu M, Wang P, Yu Y, Fang Y, Zhang F, Zheng X, Gu N, Feng G, Sham P, He L (2005) Rates of adult schizophrenia following prenatal exposure to the Chinese famine of 1959-1961. *JAMA*, 94: 557-562.
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387(6636): 917-921.
- Stefanis L (2005) Caspase-dependent and independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury. *Neuroscientist*, 11: 50-62.
- Sugita H, Fujimoto M, Yasukawa T, Shimizu N, Sugita M, Yasuhara S, Martyn JA, Kaneki M (2005) Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*, 280(14): 14203-14211.
- Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y (2006) Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. *J Nutr*, 136(3): 582-587.
- Sun K, Kusminski CM, Scherer PE (2011) Adipose tissue remodeling and obesity. *J. Clin Invest*, 121: 2094-2101.
- Susser E, Hoek HW, Brown A (1998) Neurodevelopmental disorders after prenatal famine: the story of Dutch famine study. *Am J Epidemiol*, 147: 213-216.
- Susser E, St Clair D, He L (2008) Latent Effects of Prenatal Malnutrition on Adult Health The Example of Schizophrenia. *Ann NY Acad Sci*, 1136: 185-192.
- Sutton GM, Duos B, Patterson LM, Berthoud HR (2005) Melanocortinergic modulation of cholecystokinin-induced suppression of feeding through extracellular signal-regulated kinase signaling in rat solitary nucleus. *Endocrinology*, 146(9): 3739-3747.
- Sweatt JD (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subverting synaptic plasticity and memory. *J Neurochem*, 76: 1-10.
- Swiatek K, Chao K, Chao H, Dombrowskijr (1979) The utilization of dl-[3-14c]hydroxybutyrate by malnourished rat pups. *Neuroscience*, 4(11): 1751-1760.
- Syed NA & Khandelwal RL (2000) Reciprocal regulation of glycogen phosphorylase and glycogen synthase by insulin involving phosphatidylinositol-3 kinase and protein phosphatase-1 in HepG2 cells. *Mol Cell Biochem*, 211: 123-136.

## T

- Takahashi-Yanaga F (2013) Activator or inhibitor? GSK-3 as a new drug target. *Biochemical Pharmacology*, 86: 191–199.
- Takeda K & Ichijo H (2002) Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells*, 7: 1099–1191.
- Taniguchi CM, Ueki K, Kahn R (2005) Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *J Clin Invest*, 115: 718–727.
- Taouis M (2011) Alteration of brain insulin and leptin signaling promotes energy homeostasis impairment and neurodegenerative diseases. *OCL Journal*, 18(5): 251-254.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 83: 1263-1271.
- Thomas EL & Bell JD (2003) Influence of undersampling on magnetic resonance imaging measurements of intra-abdominal adipose tissue. *International Journal of Obesity*, 27: 211–218.
- Thomas GN, Critchley JAJH, Tomlinson B, Anderson PJ, Lee ZSK, Chan JCN (2000) Obesity, Independent of Insulin Resistance, Is a Major Determinant of Blood Pressure in Normoglycemic Hong Kong Chinese. *Metabolism*, 49(12): 1523-1528.
- Thomas MA, Rice HB, Weinstock D, Corwin RL (2002) Effects of aging on food intake and body composition in rats. *Physiology and Behavior*, 76: 487–500.
- Thumelin S, Forestier M, Girard J, Pégrier JP (1993) Developmental changes in mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene expression in rat liver, intestine and kidney. *Biochem J*, 292: 493-496.
- Tiganis T (2013) PTP1B and TCPTP - non redundant phosphatases in insulin signaling and glucose homeostasis. *Febs J*, 280(2): 445-458.
- Tiikkainen M, Bergholm R, Vehkavaara S, Rissanen A, Häkkinen AM, Tamminen M, Teramo K, Yki-Järvinen H. *Diabetes* (2003) Effects of identical weight loss on body composition and features of insulin resistance in obese women with high and low liver fat content, 52(3): 701-707.
- Tonkiss J, Schultz PL, Shumsky JS, Fiacco TTA, Vincitore M, Rosene DL and Galler JR (2000) Chlordiazepoxide-induced spatial learning deficits: dose-dependent differences following prenatal malnutrition. *Pharmacol Biochem Behav*, 65: 105-116.

Tortora GJ & Grabowski SR (2003) *Principles of Anatomy and Physiology*. 10th ed. New York, NY: Wiley.

Tremblay F, Brûlé S, Hee Um S, Li Y, Masuda K, Roden M, Sun XJ, Krebs M, Polakiewicz RD, Thomas G, Marette A (2007) Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(35): 14056-14061.

Trinder P (1969) Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem*, 6: 24-27.

Tsujio I, Tanaka T, Kudo T, Nishikawa T, Shinozaki K, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Takeda M (2000) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by protein kinase C: implications for regulation of tau phosphorylation. *FEBS Lett*, 469: 111-117.

Tsujio I, Tanaka T, Kudo T, Nishikawa T, Shinozaki K, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Takeda M (2000) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by protein kinase C delta: implications for regulation of tau phosphorylation. *FEBS Lett*, 469(1): 111-117.

## U

Ueyama E, Morikawa Y, Yasuda T, Senba E (2004) Attenuation of fasting-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (ERK/p38) in the mouse hypothalamus in response to refeeding. *Neurosci Lett*, 371(1): 40-44.

Unger J, McNeill TH, Moxley RT, White M, Moss A, Livingston JN (1989) Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience*, 31: 143-157.

Unger RH (2000) Leptin physiology: a second look. *Regul Pept*, 92: 87-95.

## V

Valverde AM, Navarro P, Teruel T, Conejo R, Benito M, Lorenzo M (1999) Insulin and insulin-like growth factor I up-regulate GLUT4 gene expression in fetal brown adipocytes, in a phosphoinositide 3-kinase-dependent manner. *Biochem J*, 337: 397-405.

van Abeelen AFM, Elias SJ, Roseboom TJ, Bossuyt PMM, van der Schouw YT, Grobbee DE, Uiterwaal CSPM (2012) Postnatal Acute Famine and Risk of Overweight: The Dutch Hungerwinter Study. *International Journal of Pediatrics*. doi: 10.1155/2012/936509

van Herpen NA & Schrauwen-Hinderling VB (2008) Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav*, 94(2): 231-241.

- Vannucci SJ & Simpson IA (2003) Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285: E1127-E1134.
- Vázquez C, Sanchez C, Velasco G, Guzman M (1998) Role of carnitine palmitoyltransferase I in the control of ketogenesis in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurochem*, 71: 1597-1606.
- Veech RL (2004) The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 70: 309-319.
- Velloso LA, Araújo EP, de Souza CT (2008) Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation*, 15(3): 189-193.
- Vettor R, Fabris R, Pagano C, Federspil G (2002) Neuroendocrine regulation of eating behavior. *J Endocrinol Invest*, 25: 836-854.
- Victora CG, Adair L, Fall C, Hallal PC, Martorell, Richter L, Sachdev HS, the Maternal and Child Undernutrition Study Group (2008) Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet* 371(9609): 340-357.
- W** Wajchenberg BL (2000) Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocrine Reviews*, 21(6): 697-738.
- Wakelam MJ, Murphy GJ, Hrubby VJ, Houslay MD (1986) Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagon. *Nature*, 323: 68-71.
- Warwick ZS & Weingarten HP (1995) Determinants of high-fat diet hyperphagia: experimental dissection of orosensory and postingestive effects. *Am J Physiol*, 269(1 Pt 2): R30-37.
- Wauters M, Considine R, Van Gaal LF (2000) Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol*, 143: 293-311.
- Weickert MO (2012) What dietary modification best improves insulin sensitivity and why? *Clin Endocrinol (Oxf)*, 77(4): 508-512.
- Werther GA, Hogg A, Oldfield BJ, McKinley MJ, Figdor R, Allen AM, Mendelsohn FAO (1987) Localization and Characterization of Insulin Receptors in Rat Brain and Pituitary Gland Using in Vitro Autoradiography and Computerized Densitometry. *Endocrinology*, 121(4): 1562-1570.
- Westerbacka J, Lammi K, Häkkinen AM, Rissanen A, Salminen I, Aro A, Yki-Järvinen H (2005) Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(5): 2804-2809.

- White H & Venkatesh B (2011) Clinical review: Ketones and brain injury. *Crit Care*, 15: 219.
- Whittle AT, Marshall I, Mortimore IL, Wraith PK, Sellar RJ and Douglas NJ (1999) Neck soft tissue and fat distribution: comparison between normal men and women by magnetic resonance imaging. *Thorax*, 54: 323–328.
- Wicklow BA, Wittmeier KD, MacIntosh AC, Sellers EA, Ryner L, Serrai H, Dean HJ, McGavock JM (2012) Metabolic consequences of hepatic steatosis in overweight and obese adolescents. *Diabetes Care*, 35(4): 905–910.
- Widdowson EM (1971) Intra-uterine growth retardation in the pig. I. Organ size and cellular development at birth and after growth to maturity. *Biol Neonate*, 19: 329–340.
- Williamson DH & Whitelaw E (1978) Physiological aspects of the regulation of ketogenesis. *Biochem Soc Symp*, 43: 137–161.
- Williamson DH, Bates MW, Page MA, Krebs HA (1971). Activities of enzymes involved in acetoacetate utilization in adult mammalian tissues. *Biochem J*, 121: 41–47.
- Williamson DH, Mellanby J, Krebs HA (1962) Enzymic determination of D(-)-beta-hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. *Biochem J*, 82: 90–96.
- Wojtaszewski JF, Jorgensen SB, Hellsten Y, Hardie DG, Richter EA (2002) Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-carboxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle. *Diabetes*, 51: 284–292.
- Woods SC & Porte D (1974) Neural control of the endocrine pancreas. *Physiol Rev*, 54: 596–619.
- Wozniak M, Rydzewski B, Baker SP, Raizada MK (1993) The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. *Neurochem Int*, 22: 1–10.
- X** Xie Z, Smith CJ, Van Eldik LJ (2004) Activated glia induce neuron death via MAP kinase signalling pathway involving JNK and p38. *Glia*, 45: 170–179.
- Y** Yajnik CS & Deshmukh US (2008) Maternal nutrition, intrauterine programming and consequential risks in the offspring. *Rev Endocr Metab Disord*, 9: 203–211.
- Yajnik CS (2004) Early Life Origins of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes in India and Other Asian Countries. *J Nutr*, 134(1): 205–210.

- Yang Y, Zhu X, Chen Y, Wang X, Chen R (2007) p38 and JNK MAPK, but not ERK 1/2 MAPK, play important role in colchicine induced cortical neurons apoptosis. *Eur J Pharmacol*, 576: 26–33.
- Yasukawa T, Tokunaga E, Ota H, Sugita H, Martyn JA, Kaneki MJ (2005) S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *Biol Chem*, 280(9): 7511-7518.
- Ye J (2009) Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int. J. Obes*, 33: 54–66.
- Yki-Jarvinen H (1992) Glucose toxicity. *Endocr Rev*, 13: 415-431.
- Yoon DH, Choi SH, Yu JH, Ha JH, Ryu SH, Park DH (2012) The relationship between visceral adiposity and cognitive performance in older adults. *Age Ageing*, 41(4): 456-461. doi: 10.1093/ageing/afs018.
- Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Lazarow A, Nissim I (2001) Brain amino acid metabolism and ketosis. *J Neurosci Res*, 66: 272-281.
- Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, Kawamura M, Takemura M, Kakui K, Ogawa Y, Fujii S (2005) Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab*, 1(6): 371-378.
- Z** Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, Kim YB, Elmquist JK, Tartaglia LA, Kahn BB, Neel BG (2002) PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell*, 2(4): 489-495.
- Zeyda M & Stulnig TM (2009) Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance – A Mini-Review. *Gerontology*, 55: 379-386.
- Zhang C, Klett EL, Coleman RA (2013) Lipid signals and insulin resistance. *Clin Lipidol*, 8(6): 659-667.
- Zhu Y, Yang YG, Ahlemeyer B, Pang L, Che XM, Culmsee C, Klumpp S, Kriegstein J (2002) Transforming growth factor beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. *J Neurosci*, 22: 3898–3909.





## **VIII. ANEXOS**



## VIII. ANEXOS

### Publicaciones anexadas:

- ✚ **Lizárraga-Mollinedo E**, Fernández-Millán E, de Miguel de Santos, Martínez-Honduvilla CJ, Álvarez C, Escrivá F (2010) Early undernutrition increases glycogen content and reduces the activated forms of GSK3, AMPK, p38 MAPK and JNK in the cerebral cortex of suckling rats. *J Neurochem*, 112(1):123-133.
- ✚ **Lizárraga-Mollinedo E**, Fernández-Millán E, de Toro-Martín J, Martínez-Honduvilla CJ, Escrivá F, Álvarez C (2012) Early undernutrition induces glucagon resistance and insulin hypersensitivity in the liver of suckling rats. *Am. J. of Physiol. Endoc and Metab*, 302:E1070-E1077.
- ✚ **Lizárraga-Mollinedo E**, Álvarez C, Fernández-Millán E, Escrivá F, González-Martín C, Salas E, Pérez-Ortiz JM, Alguacil LF (2013) Undernutrition upregulates fumarate hydratase in the rat nucleus accumbens. *Metab Brain Dis*, 28(1):111-115.
- ✚ Fernández-Millán E, de Toro-Martín J, **Lizárraga-Mollinedo E**, Escrivá F, Álvarez C (2013) Role of endogenous IL-6 in the neonatal expansion and functionality of Wistar rat pancreatic alpha cells. *Diabetologia*, 56(5):1098-1107.



## Early undernutrition induces glucagon resistance and insulin hypersensitivity in the liver of suckling rats

Esther Lizarraga-Mollinedo,<sup>1</sup> Elisa Fernández-Millán,<sup>1</sup> Juan de Toro Martín,<sup>2</sup>  
Carlos Martínez-Honduvilla,<sup>2</sup> Fernando Escrivá,<sup>1,2</sup> and Carmen Álvarez<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Barcelona, Spain; and <sup>2</sup>Facultad de Farmacia, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Universidad Complutense, Madrid, Spain

Submitted 21 September 2011; accepted in final form 8 February 2012

**Lizarraga-Mollinedo E, Fernández-Millán E, de Toro Martín J, Martínez-Honduvilla C, Escrivá F, Álvarez C.** Early undernutrition induces glucagon resistance and insulin hypersensitivity in the liver of suckling rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E1070–E1077, 2012. First published February 14, 2011; doi:10.1152/ajpendo.00495.2011.—Developing brains are vulnerable to nutritional insults. Early undernutrition alters their structure and neurochemistry, inducing long-term pathological effects whose causal pathways are not well defined. During suckling, the brain uses glucose and ketone bodies as substrates. Milk is a high-fat low-carbohydrate diet, and the liver must maintain high rates of gluconeogenesis and ketogenesis to address the needs of these substrates. Insulin and glucagon play major roles in this adaptation: throughout suckling, their blood concentrations are low and high, respectively, and the liver maintains low insulin sensitivity and increased glucagon responsiveness. We propose that disturbances in the endocrine profile and available plasma substrates along with undernutrition-related changes in brain cortex capacity for ketone utilization may cause further alterations in some brain functions. We explored this hypothesis in 10-day-old suckling rats whose mothers were severely food restricted from the 14th day of gestation. We measured the plasma/serum concentrations of glucose, ketone body, insulin and glucagon, and hepatic insulin and glucagon responses. Undernutrition led to hypoglycemia and hyperketonemia to 84% ( $P < 0.001$ ) and 144% ( $P < 0.001$ ) of control values, respectively. Liver responsiveness to insulin and glucagon became increased and reduced, respectively; intraperitoneal glucagon reduced liver glycogen by 90% ( $P < 0.01$ ) in control and by 35% ( $P < 0.05$ ) in restricted. Cortical enzymes of ketone utilization remained unchanged, but their carrier proteins were altered: monocarboxylate transporter (MCT) 1 increased:  $73 \pm 14$ , controls;  $169 \pm 20$ , undernourished ( $P < 0.01$ ; densitometric units); MCT2 decreased:  $103 \pm 3$ , controls;  $37 \pm 4$ , undernourished ( $P < 0.001$ ; densitometric units). All of these changes, coinciding with the brain growth spurt, may cause some harmful effects associated with early undernutrition.

monocarboxylate transporter; glucose transporter

SOME INSULTS DURING CRITICAL phases of development can have long-term consequences. This fact has led to the concept of the developmental origin of adult disease (5). The nutritional status of the mother constitutes one of the main factors affecting the development of children. Long-term consequences of exposure to perinatal severe undernutrition, such as those that occurred in the Dutch Hunger Winter and Chinese famine, are currently being investigated. These studies show that this condition is associated with increased prevalence of pathologies like coronary diseases, diabetes, and mental disorders in adulthood (30,

37, 49, 52). Studies in animal models have indeed shown that early undernutrition has an impact on the development programming of immature mammals, causing permanent dysfunction of specific tissues. The brain has much relevance in this regard. Since the mid-1960s, undernutrition endured early in life has been known to affect central nervous system development, causing impairment in brain functions, which may be irreversible and lead to clinical disease (15). However, in most cases, the physiological/biochemical mechanisms involved are still not fully defined (56). Most studies in this area have examined the consequences of early undernutrition on offspring into adulthood. However, the period in which tissues grow is of particular importance.

Milk is a high-fat low-carbohydrate food, and the glucose it provides is inadequate for the developing brains of newborn rats and humans (10, 24). Moreover, energy metabolism in the brain during suckling relies to a large extent on ketone bodies, which are also used as precursors for various compounds (44). A number of essential adaptations in hepatic metabolism during suckling are required to cover substrate needs. The liver carries out 1) intense gluconeogenesis, to meet the glucose needs of organs, and 2) active fatty acid oxidation, to stimulate gluconeogenesis and enable active ketogenesis. These adaptations are mainly directed by insulin and glucagon (47). During the suckling period of species such as rats and humans, plasma insulin and glucagon concentrations are low and high, respectively; therefore, the insulin-to-glucagon ratio remains low (23). Changes to this balance can result in alterations in available substrates, and these hormone-substrate alterations may have an impact on the development of immature mammals (25). Significant disturbances in the biological effects of these hormones may also result from changes in liver responsiveness.

We developed a rat model of severe food restriction during the last week of gestation, which was prolonged into adulthood (18). This model is an approach to situations in which human beings have experienced severe famines. Undernourished rats underwent  $\beta$ -cell failure (39, 40), leading to chronic hypoinulinemia (18, 39). Surprisingly, these rats were not glucose intolerant since they experienced increased insulin sensitivity in adipose tissue, skeletal muscle, and heart (3, 18, 22). Recently, we reported that suckling-restricted pups showed enhanced amounts of cortical glycogen, which were confined to astrocytes, in combination with increased GLUT-1 (38). Both results prove the occurrence of alterations in this brain area of undernourished pups.

Only a few reports have explored the effects of early undernutrition on the liver's ability to respond to hormones that control the availability of metabolic substrates. The main goal

Address for reprint requests and other correspondence: F. Escrivá Pons, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain (e-mail: fescriva@farm.ucm.es).

of this study was to investigate the effects of this restriction on the endocrine and substrate profiles during suckling. Our key findings support the view that early undernutrition alters plasma insulin and glucagon levels, as well as the availability of circulating glucose and ketone bodies. This condition induces opposite changes in the hepatic response to both hormones, causing the liver of undernourished suckling rats to experience a situation that is in sharp contrast to what would normally be appropriate for this period, namely low insulin sensitivity and high glucagon responsiveness. In addition, specific monocarboxylate transporters are altered in the cortex by undernutrition. We suggest that all of these changes may be causative in regard to long-term consequences.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals, diets, and hormone treatments.** Wistar rats bred in our laboratory were used. Animals were fed a standard laboratory diet. Two groups of rats were studied. One consisted of pups from severely undernourished dams ( $n = 15$ ) with 65% food restriction during the last week of gestation and lactation. Controls were pups whose mothers ( $n = 15$ ) were given access to food ad libitum. Other characteristics of this experimental model have been previously described in detail (18). We observed no differences in the number of rats born or the survival when comparing both groups of animals. The number of pups in each litter was evened to eight. Only females were selected, to rule out potential effects due to gender differences. They were studied at age 10 days. To avoid biased results due to the peculiarity of a given litter, we have randomly selected only one pup from each litter (control or undernourished) to form the analyzed groups. The pups were killed by decapitation without anesthesia, blood was harvested from the trunk, and plasma was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The liver was quickly removed and freeze-clamped in liquid  $\text{N}_2$ . The brains were also rapidly dissected, and cerebral cortexes were harvested and immersed in  $\text{N}_2$ . Liver and cortexes were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed. In a set of experiments, conscious pups were given an intraperitoneal injection of insulin (5 IU/kg, Actrapid; Novo, Copenhagen, Denmark) or saline and killed 15 min after injection. Other groups of rats were anaesthetized with pentobarbital (2 mg/100 g body wt), the abdominal cavity was exposed, and glucagon was injected into the cava vein with the proximal end toward the liver (2  $\mu\text{g/g}$  body wt, in 40–90  $\mu\text{l}$  solution, over 15- to 25-s period, GlucaGen Hypokit; Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark). A gauze pad was placed over the exposed abdomen and kept moist with saline. At different times (as indicated in Figs. 1–5), blood was collected from the tail. At the end of experiment, the pups were killed, and the liver was harvested, as indicated above. All animals were handled in accordance with the principles and procedures of and were approved by The Committee for Animal Experimentation of the Universidad Complutense, Madrid.

**Analytic procedures.** Plasma insulin was determined with a rat insulin RIA (Linco Research, St. Louis, MO), with rat insulin for the standard curve. Sensitivity of 0.1 ng/ml was achieved with overnight equilibrium using a 100- $\mu\text{l}$  plasma sample. Serum glucagon was determined with a glucagon RIA (Linco Research). Sensitivity of 20 pg/ml was achieved using a 100- $\mu\text{l}$  serum sample in a 2-day disequilibrium assay. The coefficients of variation within and between assays were 10%. Blood or serum glucose was determined using an Accu-counted Glucose Analyzer (Roche) or by a glucose oxidase method, respectively. Blood 3-hydroxybutyrate and acetoacetate were determined in  $\text{ClO}_4\text{H}$  neutralized deproteinized extracts (58). Total ketone bodies are expressed as the sum of the concentrations of 3-hydroxybutyrate and acetoacetate. For determination of metabolites, liver frozen samples were extracted with 6% cold  $\text{ClO}_4\text{H}$  and centrifuged. The supernatant was neutralized with 0.6 M KOH and used to quantify 3-hydroxybutyrate, acetoacetate, lactate, and pyruvate (58).

Glucose was analyzed by the glucose oxidase method. Glycogen content was quantified according to Belke et al. (6); glucose resulting from enzymatic hydrolysis was quantified by the glucose oxidase method.

**Crude mitochondria preparations.** Frozen liver and brain cortex samples were homogenized with a Teflon pestle in sucrose-Tris buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.25 M sucrose, and 0.5 mM EDTA) at  $4^{\circ}\text{C}$  and centrifuged at 600 g for 10 min. The supernatants were then centrifuged at 15,000 g for 10 min. The resulting supernatants were discarded, and the mitochondrial pellets were resuspended in the buffer and sonicated. These preparations were used for the spectrophotometric analysis of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase, acetoacetyl-CoA thiolase, or 3-oxo acid CoA transferase (57). The units of the enzyme activity are nanomoles of substrate transformed per minute, and specific activity is expressed as units per milligram protein. Protein concentration was estimated by the Bradford (12) method.

**Preparation of lysates.** Sample tissues were homogenized with a Polytron in ice-cold lysis buffer, composed of 50 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium fluoride, 2 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 mM benzamidine, 10  $\mu\text{M}$  leupeptin, 10  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin, and 2 mM sodium orthovanadate. The homogenate was incubated for 60 min at  $4^{\circ}\text{C}$  with gentle stirring and then centrifuged at 100,000 g for 60 min. The supernatants were collected, assayed for protein concentration, separated into aliquots, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used.

**Western blot analyses.** The samples were subjected to SDS-PAGE on 6.5–10% polyacrylamide gels according to Laemmli (32). Proteins were then electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) filters (PVDF Protein Sequencing Membrane; Bio-Rad Laboratories, Alcobendas, Spain) for 2 h. After being transferred, the filters were blocked with 5% nonfat dry milk (for general antibodies) or with 3% BSA (for anti-phosphotyrosine antibodies) in Tris-buffered saline (TBS) followed by incubation with primary antibodies overnight. The PVDF filters were next washed four times for 10 min each time with TBS and 0.1% Tween 20, followed by 1 h incubation with appropriate secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Sigma). The PVDF filters were then washed as indicated above and subsequently exposed to an enhanced chemiluminescence reagent (Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). The bands were quantified by laser scanning densitometry (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). The presence of linearity between the time of X-ray film exposure and the optical density of the bands was initially ensured. Protein loading was assessed by reprob- ing the blots with mouse anti-rat  $\beta$ -actin.

**Immunoprecipitation.** Lysates containing 500–1,000  $\mu\text{g}$  proteins were immunoprecipitated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with gentle rotation in the presence of 2–5  $\mu\text{g}$  of the corresponding primary antibody, followed by the addition of protein A-agarose (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) or antimouse IgG-agarose (Sigma BioSciences, St. Louis, MO) for the rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies, respectively. After being mixed for 2 h, the pellets were collected by centrifugation, and the supernatants were discarded. Next, the pellets were washed and saved for Western blot analysis.

**Phosphatidylinositol 3-kinase assay.** To determine the basal and insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), aliquots of liver lysates from basal and insulin-treated rats containing 1 mg protein were immunoprecipitated with anti-insulin receptor substrate (IRS)-2 polyclonal antibody (Millipore, Temecula, CA). Immunocomplexes were collected with protein A-agarose (Roche Diagnostics). PI 3-kinase activity was assayed by phosphorylation of phosphatidylinositol with [ $^{32}\text{P}$ ]ATP (Amersham International). The radioactive phosphorylated phosphatidylinositol was analyzed and quantified using previously described procedures (55).

**Antibodies used.** The following antibodies were used: anti-MCT2, anti-phosphotyrosine, anti-glucagon receptor (Santa Cruz Biotechnol-

Table 1. *Body, liver, and brain weights and circulating glucose, ketone body, insulin, and glucagon in undernourished and control 10-day-old rats*

	Control	Undernourished
Body wt, g	21.8 ± 0.7	12.3 ± 0.2***
Liver wt, g	0.621 ± 0.015	0.347 ± 0.005***
Liver/body, %	2.84 ± 0.07	2.75 ± 0.04
Brain wt, g	0.745 ± 0.006	0.613 ± 0.005***
Brain/body, %	3.33 ± 0.07	4.97 ± 0.11***
Plasma glucose, mg/dl	153 ± 4	128 ± 3***
Blood ketone body, μmol/ml	0.83 ± 0.07	1.20 ± 0.11**
Plasma insulin, ng/ml	0.87 ± 0.14	0.29 ± 0.06***
Serum glucagon, pg/ml	128 ± 12	48 ± 2***

Values are means ± SE of 6-8 independent determinations. \*\**P* < 0.01 and \*\*\**P* < 0.001.

ogy, Santa Cruz, CA), anti-GLUT-1, anti-GLUT-2, anti-insulin receptor, anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-MCT1, anti-MCT4 (Millipore), anti-protein kinase B (Akt), anti-phospho-Akt, anti-phospho-glycogen synthase kinase (GSK) 3 α/β, anti-phospho-p70 S6K, anti-glycogen synthase (GS), anti-glycogen phosphorylase (GP) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), anti-p85α and anti-p85β regulatory sub-units of PI 3-kinase (ABCAM, San Francisco, CA), and anti-β-actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

*Statistical analysis.* Data are reported as means ± SE. The difference between two mean values is assessed with *t*-test. For multiple comparisons, significance was evaluated by ANOVA, followed by the protected least-significance test.

## RESULTS

The body and liver of undernourished rats weighed 55% less than those of control rats; however, brain weight was reduced by only 18%, and so the brain-to-body mass ratio was significantly greater for the restricted rats. Serum glucose, plasma insulin, and serum glucagon concentrations were reduced in the undernourished rats (15, 65, and 60%, respectively), and blood ketone bodies were 1.5-fold higher (Table 1). Liver glucose and lactate contents were decreased by undernutrition, and the restricted pups had higher hepatic concentrations of glycogen and ketone bodies (Table 2). We analyzed the activities of two mitochondrial enzymes involved in ketone body production and found that liver 3-hydroxybutyrate dehydrogenase remained unaffected by undernutrition (86 ± 5 vs. 89 ± 7, specific activities for undernourished and control groups, respectively), whereas acetoacetyl-CoA thiolase increased by roughly 50% in the restricted pups (102 ± 5 vs. 69 ± 7, specific activities, *P* < 0.01).

We analyzed the effects of undernutrition on liver contents of glucose transporters GLUT-1/2 and found that this condition led to an increase in both transporters (Fig. 1A). Our results

Table 2. *Liver content of glucose, glycogen, lactate, pyruvate, and ketone body in undernourished and control 10-day-old rats*

	Control	Undernourished
Glucose, mg/g	1.13 ± 0.04	0.57 ± 0.03***
Glycogen, mg/g	20.5 ± 1.3	33.4 ± 1.3***
Lactate, μmol/g	1.23 ± 0.04	0.72 ± 0.07***
Pyruvate, μmol/g	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Ketone body, μmol/g	0.88 ± 0.05	1.58 ± 0.09***

Values are means ± SE of 6-8 independent determinations. \*\*\**P* < 0.001.

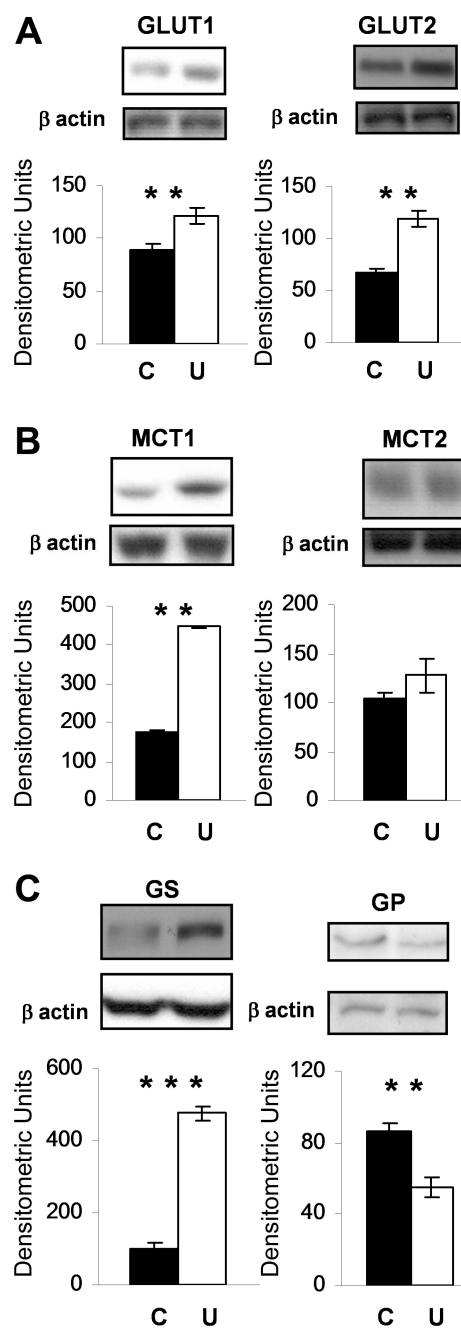


Fig. 1. A: glucose transporters (GLUT-1, GLUT-2). B: monocarboxylate transporters (MCT1, MCT2). C: glycogen synthase and phosphorylase proteins (GP, GS). Each was measured in the liver of 10-day-old rats. C, control; U, undernourished. Representative blots are shown on top. Bars on bottom represent the densitometric quantification of 6-8 independent determinations. Black bars, controls; white bars, undernourished. Results are expressed as means ± SE. Differences between control and undernourished: \*\**P* < 0.01 and \*\*\**P* < 0.001.

showed that MCT1, the predominant form in rat livers, was markedly upregulated by undernutrition, which, however, did not affect MCT2 (Fig. 1B). We also analyzed the protein expression of GS and GP, which are key rate-limiting enzymes of glycogen metabolism. GS protein underwent a large increase in restricted rats, approximately a fivefold increase above control values, whereas GP was decreased (Fig. 1C).

We next analyzed several steps in the liver insulin-signaling pathway. We found no alterations in the content of the following proteins: insulin receptor, IRS-1 and  $\alpha$ - and  $\beta$ -isoforms of p85, the PI 3-kinase regulatory subunit (Fig. 2A). However, we found that IRS-2 abundance, IRS-2 basal phosphorylation, and the basal level of IRS-2 associated with insulin receptor were significantly increased in undernourished rats (Fig. 2B). The content of Akt, a substrate of PI 3-kinase, and basal phospho-Akt were upregulated by undernutrition (Fig. 2C). Basal PI 3-kinase activity associated with IRS-2 was very low in the two populations of rats; however, following insulin stimulation, this activity increased more in the restricted animals than in the control animals (Fig. 2D). GSK3, which is implicated in the regulation of glycogen synthesis, is a downstream target of Akt. As shown in Fig. 3A, phospho-GSK3 $\beta$ , the most abundant isoform in the liver, was higher in undernourished rats than in control rats after insulin treatment. We found that insulin induced an increase in P70 S6 kinase phosphorylation in both populations of rats, as expected; however, basal levels of phospho-P70 S6 kinase were already higher in the undernourished rats (Fig. 3B).

Glucagon receptor content underwent a sharp reduction in undernourished pups (Fig. 4A). We measured the effects of intravenous glucagon on glycemia and hepatic glycogen. Blood glucose increased gradually in control rats during the 30 min following this treatment; however, glycemia only showed a modest initial tendency to increase in the restricted rats and after it remained unchanged, under the control values (Fig. 4B). In terms of liver glycogen content, glucagon caused a large reduction (90%) in the well-fed animals. In the restricted rats, whose basal proportion was increased, the reduction promoted by this hormone was significantly weaker (65%) (Fig. 4C).

We then analyzed the ketone body metabolizing enzymes in cortical mitochondria from the two groups of rats: 3-hydroxybutyrate dehydrogenase, 3 oxoacid CoA-transferase, and acetyl-CoA thiolase. When the specific activities were compared, no differences were found:  $14 \pm 1$  vs.  $12 \pm 0.5$  for dehydrogenase;  $5 \pm 0.4$  vs.  $4 \pm 0.8$  for transferase, and  $14 \pm 2$  vs.  $16 \pm 2$  for thiolase, in the control and undernourished animals, respectively. Finally, we evaluated the effects of undernutrition on the cortical amount of three monocarboxylate transporters and found that this condition upregulated

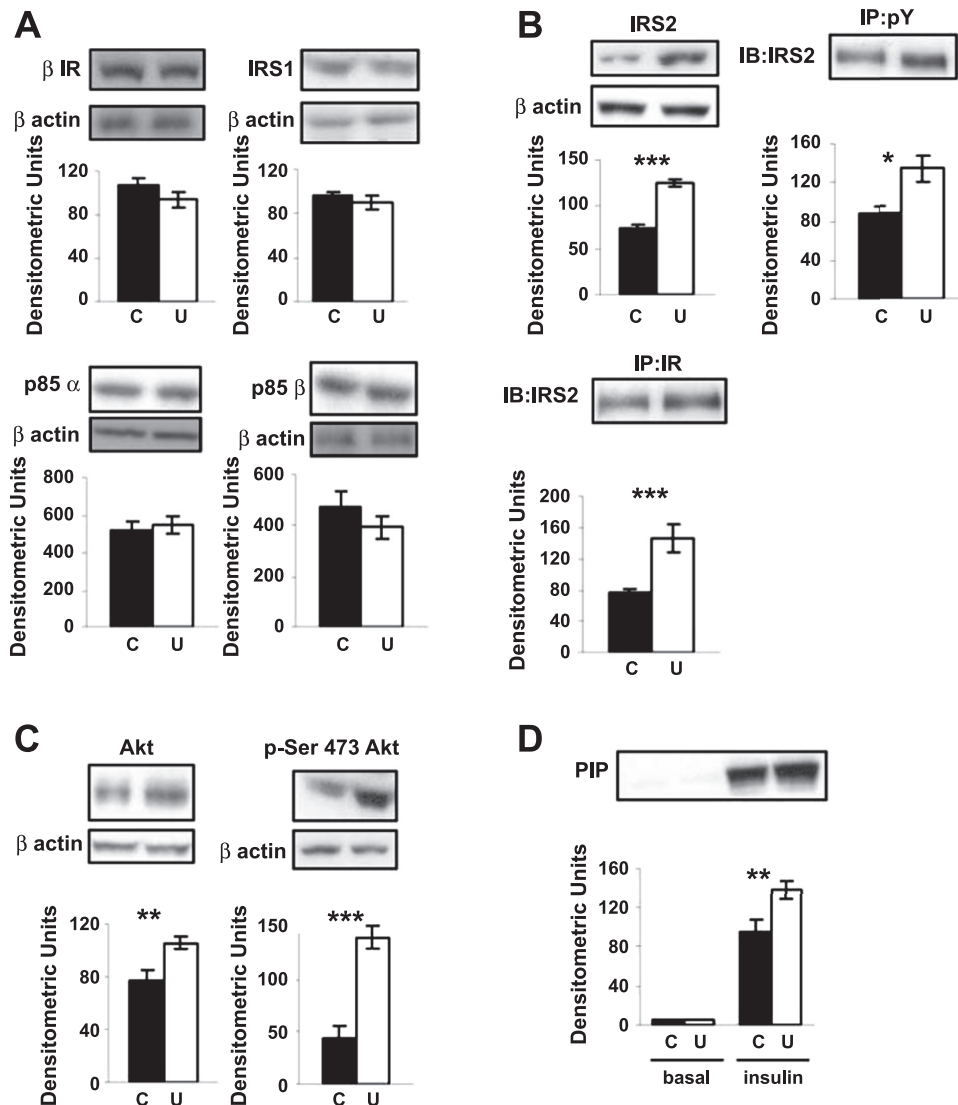
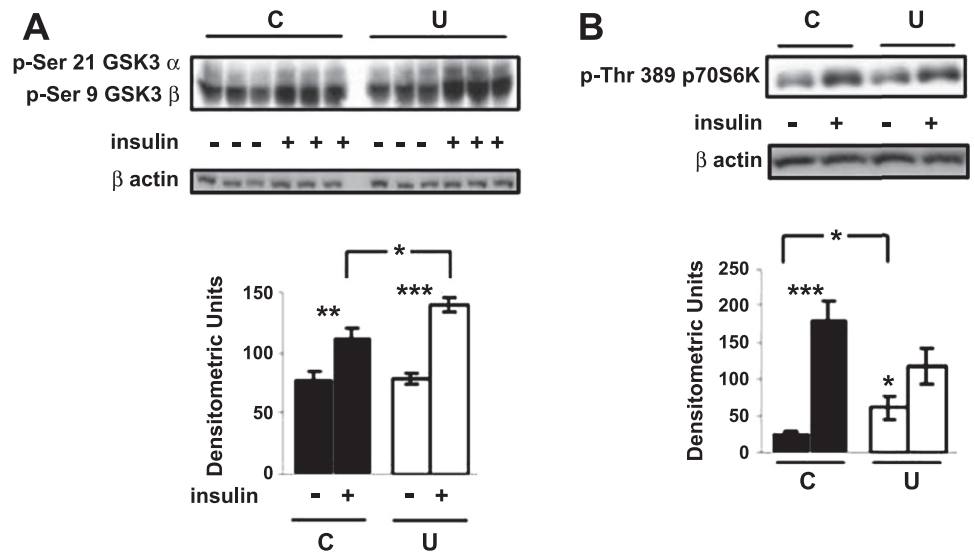


Fig. 2. A: insulin receptor (IR), insulin receptor substrate-1 (IRS-1), p85 $\alpha$  and p85 $\beta$  subunits of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase). B: insulin receptor substrate-2 (IRS-2), phospho-Tyr IRS-2, IR-associated IRS-2. C: protein kinase B (Akt), phospho-Ser-473 Akt. D: activity of IRS-2-associated PI 3-kinase. Liver of 10-day-old rats. The analysis of phospho-Tyr IRS-2 and IR-associated IRS-2 was made in liver lysates previously immunoprecipitated with anti-phosphotyrosine and anti-insulin receptor, respectively, followed by Western blotting. The activity of IRS-2-associated PI 3-kinase was determined in the basal and insulin-treated conditions, as described in MATERIALS AND METHODS, and was assayed in immunocomplexes from liver lysates treated with anti-IRS-2 antibody, as indicated in MATERIALS AND METHODS. Representative immunoblots (IB) and autoradiogram are shown. Bars represent means  $\pm$  SE for 6–8 independent determinations. Black bars, controls; white bars, undernourished. Differences between control and undernourished: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ .

Fig. 3. Content of phospho-glycogen synthase kinase (GSK) 3 (A) and phospho-P70 S6 kinase (B) in liver of suckling rats, in the basal and insulin-treated conditions, as indicated in MATERIALS AND METHODS. Representative blots are shown. Data in bars represent means  $\pm$  SE from quantitative analysis of 6–8 independent determinations. Black bars, controls; white bars, undernourished. Differences between control and undernourished and between basal and insulin-treated: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ .



MCT1 and reduced the content of MCT2, without changing MCT4 (Fig. 5).

**DISCUSSION**

*Characteristics of undernourished rats.* There is evidence that some long-term consequences of early undernutrition are sex-specific, such as obesity (49) or schizophrenia (52). In the present work, we have studied only females, so possible gender differences in the found effects cannot be inferred. At  $\sim$ 10 days of age, the rat brain undergoes a transient growth spurt, which involves an increase in metabolism and is a period of enhanced vulnerability. The offspring of rat dams that were undernourished during the last week of pregnancy and lactation were restricted in their growth, although the brain was less affected than the rest of the body (“brain sparing effect”) (35). To maintain its high growth rate, the developing brain is supplied with glucose and ketone bodies (14). We found that the decrease in plasma glucose associated with undernutrition was accompanied by a rise in ketone bodies, as reported in models of specific protein restriction (21), showing that this adaptation is independent of the type of restriction. In adults,

brain glucose consumption slows down with prolonged fasting, a condition that enhances cerebral ketone body extraction from blood. Nevertheless, during immaturity, increased plasma levels of ketone bodies coinciding with hypoglycemia may not necessarily be beneficial. Thus, an increase of 3-hydroxybutyrate in plasma in rat pups submitted to hypoglycemic coma worsened their recovery (51). In addition, ketosis can alter the transport of amino acids across the blood-brain barrier (BBB) (60). Glucose and ketone bodies play complementary roles in the brain, and both are used for energy production. Glucose also provides precursors for neurotransmitter synthesis and the pentose phosphate cycle. In contrast, ketone bodies mainly serve to generate acetyl-CoA, which is used to synthesize lipids and amino acids (43). Changes in their availability during the brain growth spurt may have deleterious impacts on these pathways.

*Insulin and glucagon liver sensitivity.* Insulin resistance during suckling contributes to the high maintenance rate of hepatic gluconeogenesis. In addition, the low stimulation of glucose utilization by insulin in peripheral tissues increases its availability to the brain. Early undernutrition enhances insulin

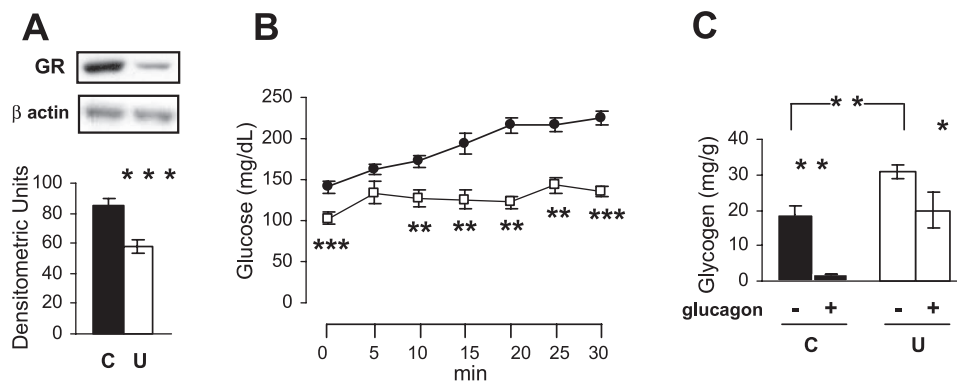


Fig. 4. A: glucagon receptor (GR) content in liver from control and undernourished 10-day-old rats. Representative blots are shown. Bars represent the means  $\pm$  SE for 6–8 independent determinations. Black bars, control; white bars, undernourished. B: plasma glucose levels in the basal condition and after glucagon injection in control (●) and undernourished (□) suckling rats, as described in MATERIALS AND METHODS. Each point represents the mean  $\pm$  SE from 8 independent determinations. C: glycogen content in the liver of suckling rats in the basal condition and 30 min after glucagon treatment, as indicated in MATERIALS AND METHODS. Bars represent the means  $\pm$  SE from 8 independent analyses. Filled bars, control; open bars, undernourished. Differences between control and undernourished and between basal and glucagon-treated: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ .

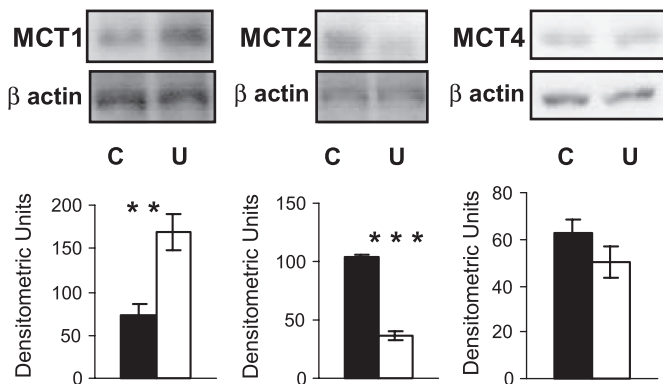


Fig. 5. Monocarboxylate transporter proteins MCT1, MCT2, and MCT4 in the cortex from 10-day-old control and undernourished rats. Representative blots are shown on top. Bars on bottom represent the densitometric quantifications of 6–8 independent determinations. Black bars, control; white bars, undernourished. Differences between control and undernourished: \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

sensitivity in extrahepatic tissues, such as muscle and adipose tissue, in adulthood (16, 18, 27, 45), but the impact of this restriction on the adult or immature liver has been less frequently addressed. Suckling rats from dams on hypoproteic diets throughout pregnancy and lactation show increased hepatic glycogen (21, 26), as found herein in pups from globally restricted rats, indicating that this response is independent of the type of restriction. The increased amounts of GLUTs and GS and the low levels of GP suggest elevated rates of glucose uptake and glycogen production, which is supported by reduced hepatic contents of free glucose and lactate. These results provide for the first time an explanation of the increased glycogen associated with early undernutrition. Insulin increases GS and inhibits GP (20, 53). Therefore, considering the hypoinsulinemia of restricted rats, our findings are consistent with liver insulin hypersensitivity associated with glucose metabolism, as previously seen in extrahepatic tissues but never explored in the liver. Hepatic levels of the insulin receptor, IRS-1, and the regulatory subunits of PI 3-kinase were not affected. However, IRS-2 and Akt levels were enhanced. In addition, activation of IRS-2-associated PI 3-kinase was significantly increased in the liver of undernourished rats. Following insulin treatment, GSK-3 $\beta$  phosphorylation exceeded the control value. The amount of the phosphorylated form of p70 S6 kinase was increased in undernourished rats at baseline. Taken together, these findings support an insulin-sensitizing effect of maternal food restriction on the liver of suckling rats. Hepatic IRS-1 and IRS-2 are preferentially linked to glucose and lipid metabolism, respectively (54). However, while IRS-1 remained unaltered, the increased glycogen stores in undernourished rats coincided with upregulated IRS-2, which suggests its involvement in glucose homeostasis during suckling.

Plasma glucagon levels were very low in undernourished rats, as reported by others in fetal and suckling rats from food-restricted mothers (4). Because this hormone decreased in a similar proportion to insulin, the insulin-to-glucagon ratio was not altered. However, food restriction strongly reduced the content of liver glucagon receptors. Ozanne et al. (46) also reported a decrease in glucagon receptors in the adult male offspring of dams fed a protein-restricted diet during preg-

nancy and lactation (46). We found that some in vivo glucagon responses were significantly diminished in the restricted pups, a result not previously reported: stimulation of liver glycogenolysis was weak, and there was virtually no increase in glycemia. Thus it seems clear that early undernutrition leads to hepatic glucagon resistance with insulin hypersensitivity.

*Liver ketogenesis.* Although reduced utilization cannot be ruled out to explain the hyperketonemia of undernourished rats, it seems to be primarily attributable to increased hepatic ketogenesis, as deduced from the elevated liver ketone body content. The rise in acetoacetyl-CoA thiolase activity is consistent with this proposition. The activation of ketogenesis takes place despite the reduced supply of milk fat, which suggests that fatty acid oxidation is increased compared with esterification. Carnitine acyltransferase I is inhibited by malonyl-CoA, whose major source in the liver is glucose derived from glycogen (41). Therefore, the blunted glycogenolysis in the restricted rats should facilitate the diversion of fatty acid metabolism toward ketone body production.

Insulin and glucagon play major opposing roles in the control of ketogenesis. This metabolic pathway increases concomitantly to low and high liver responses to insulin and glucagon, respectively, which is the opposite condition set by undernutrition in the suckling rats. This fact has not been previously described, to our knowledge. These results show that an increase in hepatic insulin sensitivity during suckling does not necessarily prevent high rates of ketone body production. Regarding glucagon resistance, it seems that stimulated ketogenesis associated with undernutrition is derived from nonglucagon mechanisms (33). It has been shown that catecholamines, which induce lipolysis, have no direct ketogenic effects on the liver (9). In contrast, glucocorticoids may be hormones that are directly involved in the activation of ketogenesis (13). Offspring from protein-restricted pregnant rats have increased liver expression of glucocorticoid receptors during suckling and adulthood (8). Moreover, these hormones, in synergy with insulin, increase both ketogenesis and glycogen synthesis in hepatocytes in vitro (2), two conditions seen in the liver of the undernourished pups. In any case, this condition of hyperproduction of ketones along with increased and decreased insulin and glucagon actions, respectively, has not been previously reported.

Because undernutrition induced a rise in MCT1, it seems likely that the livers of restricted rats develop higher capacities for exporting ketone bodies. The modulation of MCT1 synthesis is not well understood, but it has been shown that it is upregulated by peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  activation in fasting (29). It may be the same for restricted pups.

*Ketone body transporters in the cortex.* Enzyme activity for metabolizing ketone bodies remained unaltered in the cortex of restricted pups. However, the main factor controlling their rate of utilization is availability (28). Three main MCT forms have been identified in the central nervous system. The only one contained by BBB endothelial cells is MCT1, while neurons coexpress MCT1 and MCT2 and glial cells coexpress MCT1 and MCT4 (42). The cortical content of MCT1 was increased in undernourished hyperketonemic rats, which is in accordance with the upregulation reported in brain endothelial cells of rats on ketogenic diets (36). This adaptation probably contributes to increase the ketone body uptake by astrocytes surrounding the

cortical capillaries. MCT2, the exclusively neuronal form (7), underwent a marked decrease. This reduction may limit the entry of ketone bodies into neurons, which is perhaps an adaptation to prevent its buffering capacity from overloading and the fall of cytosolic pH. Some MCT2 is located in synapses and undergoes intracellular trafficking (7). Changes in its expression participate in processes of synaptic plasticity (50). All of these changes in MCTs of restricted pups, here seen for the first time, suggest possible consequences as alterations in synapses. A question arises as to whether the changes in cortical MCTs may also have an impact on lactate transport, whose blockade has deleterious effects in vivo (1). In this regard, it should be noted that MCT2 has the highest affinity for lactate (42). Ketone bodies are involved in hypothalamic control of feeding by insulin and leptin (31). The inhibition of food intake is blunted in rats that develop hyperketonemia and high transport rates of ketone bodies across the BBB (19). The possibility arises that changes in plasma ketone bodies and cortical MCTs found in immature undernourished rats alter hypothalamic control of feeding and lead to increased obesity risk.

According to programming hypothesis, undernutrition during immaturity predisposes to disturbances that resemble the metabolic syndrome (5, 59). Offspring nursed by dams globally food restricted during part of pregnancy and throughout lactation, a model close to that studied in this work, present increased risk of obesity in adulthood (17) and deficiencies in endocrine pancreas adaptation to gestation (11), showing long-lasting effects of early undernutrition. On the other hand, a number of the metabolic/endocrine alterations associated with the global restriction applied in the present study are comparable to other reported models based on protein restriction, a similarity that strengthens the importance of specific protein deficiency on the consequences of early undernutrition.

As stated, one of these consequences is predisposition to obesity, probably because of changes in the appetite hypothalamic regulatory systems, since they are vulnerable to early endocrine and metabolic disturbances (48). In fact, early undernutrition can also lead to alterations in brain functions, as reviewed by Laus et al. (34). The present work shows that undernourished rats experience hormonal and glucoregulation alterations that could affect the appetite regulation. Within this context, we are analyzing the hypothalamus of these animals in a work in progress. Preliminary unpublished data show modifications in hypothalamic insulin signaling when these rats reach adulthood, so we are also testing whether these changes could increase the risk of obesity.

#### GRANTS

This work was supported by Grants BFU2008-02930 and BFU2011-25420 from the Ministerio de Ciencia e Innovación; CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas; Proyecto CCG97-UCM/SAL-30041; Grupo de Investigación Santander-UCM 950610; and Proyecto P2010/BMD-2423, Comunidad de Madrid.

#### DISCLOSURES

The authors have nothing to disclose.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: E.L.-M., E.F.-M., F.E., and C.A. conception and design of research; E.L.-M., E.F.-M., J.d.T.M., C.J.M.-H., F.E., and C.A. performed experiments; E.L.-M., J.d.T.M., C.J.M.-H., F.E., and C.A. analyzed

data; E.L.-M., E.F.-M., C.J.M.-H., F.E., and C.A. interpreted results of experiments; E.L.-M., J.d.T.M., F.E., and C.A. prepared figures; E.L.-M., C.J.M.-H., F.E., and C.A. drafted manuscript; E.L.-M., E.F.-M., F.E., and C.A. edited and revised manuscript; E.L.-M., E.F.-M., F.E., and C.A. approved final version of manuscript.

#### REFERENCES

1. **Adle-Biasette H, Olivier P, Verney C, Fontaine RH, Evrard P, Hénin D, Massias L, Gressens P, Baud O.** Cortical consequences of in vivo blockade of monocarboxylate transport during brain development in mice. *Pediatr Res* 61: 54–60, 2007.
2. **Agius L, Chowdhury MH, Alberti KG.** Regulation of ketogenesis, gluconeogenesis and the mitochondrial redox state by dexamethasone in hepatocyte monolayer cultures. *Biochem J* 239: 593–601, 1986.
3. **Agote M, Goya L, Ramos S, Álvarez C, Gavete ML, Pascual-Leone AM, Escrivá F.** Glucose uptake and glucose transporter proteins in skeletal muscle from undernourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1101–E1109, 2001.
4. **Alvarez E, Fernández S, Blázquez E.** Effect of maternal food restriction on circulating insulin and glucagon levels and on liver insulin and glucagon binding sites of fetal and suckling rats. *Diabetes Metab* 12: 337–345, 1986.
5. **Barker DJ.** The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl* 93: 26–33, 2004.
6. **Belke DD, Larsen TS, Gibbs EM, Severson DL.** Glucose metabolism in perfused mouse hearts overexpressing human GLUT-4 glucose transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E420–E427, 2001.
7. **Bergersen LH.** Is lactate good for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience* 145: 11–19, 2007.
8. **Bertram C, Trowern AR, Copin N, Jackson AA, Whorwood CB.** The maternal diet during pregnancy programs altered expression of glucocorticoid receptor and type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology* 142: 2841–2853, 2001.
9. **Beylot M.** Regulation of in vivo ketogenesis: role of free fatty acids and control by epinephrine, thyroid hormones, insulin and glucagon. *Diabetes Metab* 22: 299–304, 1996.
10. **Bier DM, Leake RD, Haymond MW, Arnold KJ, Gruenke LD, Sperling MA, Kipnis DM.** Measurement of “true” glucose production rates in infancy and childhood with 6,6-dideuteroglucose. *Diabetes* 26: 1016–1023, 1977.
11. **Blondeau B, Garofano A, Czernichow P, Bréant B.** Age-dependent inability of the endocrine pancreas to adapt to pregnancy: a long-term consequence of perinatal malnutrition in the rat. *Endocrinology* 140: 4208–4213, 1999.
12. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72: 248–254, 1976.
13. **Cagdas DN, Pac FA, Cakal E.** Glucocorticoid-induced diabetic-ketoacidosis in acute rheumatic fever. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 13: 298–300, 2008.
14. **Cotter DG, d’Avignon DA, Wentz AE, Weber ML, Crawford PA.** Obligatory role for ketone body oxidation in neonatal metabolic homeostasis. *J Biol Chem* 286: 6902–6910, 2011.
15. **Coursin DB.** Effects of undernutrition on central nervous system function. *Nutr Rev* 23: 65–68, 1965.
16. **Dean DJ, Cartee GD.** Calorie restriction increases insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor and insulin receptor substrate-1 in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 169: 133–139, 2000.
17. **Desai M, Gayle D, Babu J, Ross M.** The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. *Am J Obstet Gynecol* 196: 555e1–e557, 2007.
18. **Escrivá F, Rodríguez C, Cacho J, Alvarez C, Portha B, Pascual-Leone AM.** Glucose utilization and insulin action in adult rats submitted to prolonged food restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 263: E1–E7, 1992.
19. **Fisler JS, Shimizu H, Bray GA.** Brain 3-hydroxybutyrate, glutamate, and GABA in a rat model of dietary obesity. *Physiol Behav* 45: 571–577, 1989.
20. **Fujita N, Katu K, Okubo M, Nagasaka Y, Kaneko T.** Insulin stimulates protein synthesis of glycogen synthase in rat hepatoma H4 cells associated with acceleration of translation rate. *Endocr J* 43: 313–320, 1996.

21. Gamallo JL, Perry ML, Trindade VM, Pereira IR, Bernard EA. Effect of pre- and postnatal protein undernutrition on glycemia, ketonemia and liver glycogen concentration in suckling rats. *Ann Nutr Metab* 33: 266–270, 1989.
22. Gavete ML, Agote M, Martín MA, Álvarez C, Escrivá F. Effects of chronic undernutrition on glucose uptake and glucose transporter proteins in rat heart. *Endocrinology* 143: 4295–4303, 2002.
23. Girard J, Ferré P, Pégorier JP, Duée PH. Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiol Rev* 72: 507–562, 1992.
24. Girard JR, Guillet I. Glucose turnover rate in newborn rats. *Biochem J* 148: 345–347, 1975.
25. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr* 71, Suppl 5: 1344S–1352S, 2000.
26. Gosby AK, Maloney CA, Phuyal JL, Denyer GS, Bryson JM, Catterson ID. Maternal protein restriction increases hepatic glycogen storage in young rats. *Pediatr Res* 54: 413–418, 2003.
27. Gosby AK, Maloney CA, Catterson ID. Elevated insulin sensitivity in low-protein offspring rats is prevented by a high-fat diet and is associated with visceral fat. *Obesity (Silver Spring)* 18: 1593–1600, 2010.
28. Hawkins RA, Williamson DH, Krebs HA. Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. *Biochem J* 122: 13–18, 1971.
29. König B, Koch A, Giggel K, Dordschbal B, Eder K, Stangl GI. Monocarboxylate transporter (MCT)-1 is up-regulated by PPARalpha. *Biochim Biophys Acta* 1780: 899–904, 2008.
30. Kyle UG, Pichard C. The Dutch Famine of 1944–1945: a pathophysiological model of long term consequences of wasting disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9: 386–394, 2006.
31. Laeger T, Metges CC, Kuhla B. Role of beta-hydroxybutyric acid in the central regulation of energy balance. *Appetite* 54: 450–455, 2010.
32. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685, 1970.
33. Laffel L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 15: 412–426, 1999.
34. Laus MF, Vales LD, Costa TM, Almeida SS. Early postnatal protein-calorie malnutrition and cognition: a review of human and animal studies. *Int J Environ Res Public Health* 8: 590–612, 2011.
35. Lee KH, Calikoglu AS, Ye P, D'Ercole AJ. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) ameliorates and IGF binding protein (IGFBP-1) exacerbates the effects of undernutrition on brain growth during early postnatal life: studies in IGF-I and IGFBP-1 transgenic mice. *Pediatr Res* 45: 331–336, 1999.
36. Leino RL, Gerhart DZ, Duelli R, Enerson BE, Drewes LR. Diet-induced ketosis increases monocarboxylate transporter (MCT1) levels in rat brain. *Neurochem Int* 38: 519–527, 2001.
37. Li Y, Qi L, Jaddoe VW, Feskens EJ, Yang X, Ma G, Hu FB. Exposure to the Chinese famine in early life and the risk of hyperglycemia and type 2 diabetes in adulthood. *Diabetes* 59: 2400–2406, 2010.
38. Lizárraga-Mollinedo E, Fernández-Millán E, de Miguel-Santos L, Martínez-Hondurilla CJ, Álvarez C, Escrivá F. Early undernutrition increases glycogen content and reduces the activated forms of GSK3, AMPK, p38 MAPK, and JNK in the cerebral cortex of suckling rats. *J Neurochem* 112: 123–133, 2010.
39. Martín MA, Álvarez C, Goya L, Portha B, Pascual-Leone AM. Insulin secretion in adult rats that had experienced different underfeeding patterns during their development. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 272: E634–E640, 1997.
40. Martín MA, Fernández E, Pascual-Leone AM, Escrivá F, Alvarez C. Protein calorie restriction has opposite effects on glucose metabolism and insulin gene expression in fetal and adult rat endocrine pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E542–E550, 2004.
41. McGarry JD, Foster DW. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem* 49: 395–420, 1980.
42. Merezhinskaya N, Fishbein WN. Monocarboxylate transporters: past, present and future. *Histol Histopathol* 24: 243–264, 2009.
43. Morris AA. Cerebral ketone body metabolism. *J Inherit Metab Dis* 28: 109–121, 2005.
44. Nehlig A. Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70: 265–275, 2004.
45. Ozanne SE, Nave BT, Wang CL, Shepherd PR, Prins J, Smith GD. Poor fetal nutrition causes long-term changes in expression of insulin-signaling components in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 273: E46–E51, 1997.
46. Ozanne SE, Smith GD, Tikerpaee J, Hales CN. Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams. *Am J Physiol* 270: E559–E564, 1996.
47. Pégorier JP, Prip-Buus C, Duee PH, Girard J. Hormonal control of fatty acid oxidation during the neonatal period. *Diabetes Metab* 18: 156–160, 1992.
48. Plagemann A, Harder T, Rake A, Melchior K, Rhode W, Dörner G. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rats. *J Nutr* 130: 2582–2590, 2000.
49. Ravelli ACJ, van der Meulen JHP, Osmond C, Barker DJP, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 70: 811–816, 1999.
50. Robinet C, Pellerin L. Brain-derived neurotrophic factor enhances the expression of the monocarboxylate transporter 2 through translational activation in mouse cultured cortical neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 286–298, 2010.
51. Schuz PW, Wong PK, O'Kusky J, Innis SM, Stockler S. Effects of D-3-hydroxybutyrate treatment on hypoglycaemic coma in rat pups. *Exp Neurol* 227: 180–187, 2011.
52. Susser ES, Lin SP. Schizophrenia after prenatal exposure to the Dutch Hunger Winter of 1944–1945. *Arch Gen Psychiatry* 49: 983–988, 1992.
53. Syed NA, Khandelwal RL. Reciprocal regulation of glycogen phosphorylase and glycogen synthase by insulin involving phosphatidylinositol-3 kinase and protein phosphatase-1 in HepG2 cells. *Mol Cell Biochem* 211: 123–136, 2000.
54. Taniguchi CM, Ueki K, Kahn R. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *J Clin Invest* 115: 718–727, 2005.
55. Valverde AM, Navarro P, Teruel T, Conejo R, Benito M, Lorenzo M. Insulin and insulin-like growth factor I up-regulate GLUT4 gene expression in fetal brown adipocytes, in a phosphoinositide 3-kinase-dependent manner. *Biochem J* 33: 397–405, 1999.
56. Warner MJ, Ozanne SE. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem J* 427: 333–347, 2010.
57. Williamson DH, Bates MW, Page MA, Krebs HA. Activities of enzymes involved in acetoacetate utilization in adult mammalian tissues. *Biochem J* 121: 41–47, 1971.
58. Williamson DH, Mellanby J, Krebs HA. Enzymic determination of D(-)-beta-hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. *Biochem J* 82: 90–96, 1962.
59. Yajnik CS, Deshmukh US. Maternal nutrition, intrauterine programming and consequential risks in the offspring. *Rev Endocr Metab Disord* 9: 203–211, 2008.
60. Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Lazarow A, Nissim I. Brain amino acid metabolism and ketosis. *J Neurosci Res* 66: 272–281, 2001.

## Early undernutrition increases glycogen content and reduces the activated forms of GSK3, AMPK, p38 MAPK, and JNK in the cerebral cortex of suckling rats

Esther Lizárraga-Mollinedo,\* Elisa Fernández-Millán,\* Laura de Miguel-Santos,\*†  
Carlos José Martínez-Honduvilla,† Carmen Alvarez\*† and Fernando Escrivá\*†

\*CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) Spain

†Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid, Spain

### Abstract

Exposure to maternal undernutrition during development increases the risk for neurological and cognitive defects. However, little is known about the underlying mechanisms involved. Peripheral responses to insulin are increased following food-restriction, thus the possibility arises that brain insulin actions are affected by undernutrition, causing damages to the higher cerebral functions. In this study, we examined the effects of early undernutrition on molecular targets of insulin actions such as glucose transporters, glycogen, glycogen synthase kinase-3 (GSK3) and mitogen-activated protein kinases, as well as proteins involved in apoptosis in the cortex from 10-day-old rats. We show that undernutrition results in an enhanced glycogen content which is confined to astrocytes, according to our histochemical approaches. Cor-

tical phospho-GSK3 is also increased. In addition to glycogen synthesis, GSK3 regulates crucial cellular processes. Therefore, its elevated degree of phosphorylation may have an impact on these processes and, consequently, on the cortical development. Phospho-p38 and both total JNK and phospho-JNK, which regulate apoptosis, are reduced following undernutrition. However, cleaved caspase 3 is not altered, which suggests that this condition does not induce extensive modifications to the cortical apoptosis. Thus, our results indicate that undernutrition gives rise to molecular alterations that may have repercussions on cerebral cortex development and functions.

**Keywords:** cerebral cortex, glucose transporters, glycogen, insulin, mitogen-activated protein kinase, undernutrition.

*J. Neurochem.* (2010) **112**, 123–133.

Undernutrition is a worldwide problem affecting a large segment of the population. When occurring during critical periods of development it is linked to an increased risk of several diseases in adult life such as cardiovascular disorders, insulin resistance and obesity (Gluckman and Hanson 2004). Both the peripheral and CNSs are also vulnerable to protein-energy restriction, which results in alterations in several ontogenic steps of development such as cell proliferation and migration, synapsis number, dendritic branching, myelination etc. (Bedi *et al.* 1980; Chopra and Sharma 1992; Escobar and Salas 1995). Findings from several studies have indicated that undernutrition during the fetal and neonatal stages can lead to potentially irreversible neuropathological consequences. In animal models, it is well-known that early undernutrition has repercussions on exploratory behavior (Almeida *et al.* 1996) and memory (Tonkiss *et al.* 2000). In humans, restricted nutrition increases the risk of psychiatric and psychosocial disorders, such as depression (Susser *et al.*

1998), schizophrenia (St Clair *et al.* 2005) and aggressive behavior (Liu and Raine 2006), pathologies in which specific cortical areas seem to be involved. Electroencephalographic recordings from severely undernourished infants have shown abnormalities that suggest impaired maturation of the cortex, which is the CNS region directly involved in cognitive as well as executive functions (Hayakawa *et al.* 2003). However, studies in humans of whether poor nutrition during

Received February 10, 2009; revised manuscript received October 9, 2009; accepted October 9, 2009.

Address correspondence and reprint requests to Prof. Fernando Escrivá Pons, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. E-mail: fescriva@farm.ucm.es

**Abbreviations used:** ACC, acetyl-CoA carboxylase; AMPK, AMP-activated protein kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GLUT, glucose transporter; GSK3, glycogen synthase kinase-3; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase.

perinatal periods might cause deficits in learning ability are not conclusive. Undernourished children are, in general, economically unfavored, a situation that contributes to impairment of mental proficiency and masks possible specific impacts of food-restriction on learning tasks (Ivanovic *et al.* 2002).

Contrary to early views, the CNS is sensitive to insulin: this hormone and its receptors and downstream effectors are widely distributed in nervous tissue. Brain insulin has diverse roles, such as regulation of food intake, body weight, energy homeostasis and reproduction (reviewed by Plum *et al.* 2006). Other functions that insulin exerts in the CNS are not fully elucidated but receive a lot of attention, such as implications of this hormone in cognitive functions. Administration of insulin improves memory and attention (Park *et al.* 2000; Kern *et al.* 2001). Deterioration of nervous insulin/insulin receptor actions is associated with clinical disorders in which the prominent symptom is memory impairment, such as in patients of Alzheimer's disease; furthermore, insulin improves memory and performance in these patients (Craft 2007). Diabetes mellitus can affect the CNS in some ways that result in cognitive deficits, although the pathological mechanisms are still unknown (Awad *et al.* 2004; Biessels and Gispen 2005).

Undernutrition influences glucose homeostasis: insulin responses in heart and skeletal muscle are increased by this condition (Escrivá *et al.* 1992; Gavete *et al.* 2005). Studies on the relationship between poor nutrition and insulin signaling in the CNS are few and, in fact, it is not known whether a similar adaptation is established in some areas of immature brain. However, it is conceivable that pathophysiological conditions that alter insulin actions in peripheral tissues might also modify the insulin responses in the CNS. One of the well-known effects of insulin in liver and muscle tissue is the activation of signaling pathways that induce glycogen synthesis. There is evidence that brain glycogen is also sensitive to insulin (Choi *et al.* 2003). It is suspected that brain glycogen may play roles in some higher functions during development (Gibbs *et al.* 2007) but, to the best of our knowledge, there are no reports on the effects of undernutrition on glycogen content in the cerebral cortex.

Another signaling pathway stimulated by insulin is that of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). These protein kinases are widely distributed in mammalian tissues, including the CNS, and they act on various cellular processes such as differentiation, cell fate and synaptic plasticity (Thomas and Haganair 2004). Indeed, cerebral MAPKs are associated with programmed cell death, because they can influence the expression and activation of pro-apoptotic and pro-survival proteins (Mielke and Herdegen 2000). It has been shown that caloric restriction can modulate basal activity of the MAPKs pathways in the brain of aged rats (Zhen *et al.* 1999). The functions regulated by MAPKs are crucial during brain development. However, the effects of early undernutrition on

these protein kinases in the immature cerebral cortex are largely unknown.

We have developed a rat model of undernutrition based on food-restriction that begins in the fetal stage and continues during suckling (Escrivá *et al.* 1992). This model is applied in the present work. Our study was conducted in a defined brain structure from suckling rats, the cerebral cortex, and it mainly focussed on the effects of undernutrition on glycogen, AMPK, MAPKs and some proteins directly involved in cell death/survival. Taking into account that suckling constitutes a critical period for brain development; our aim is to investigate the alterations established in the cortex by restricted nutrition at this vulnerable development stage, since they may have adverse repercussions in the CNS and cause long-term functional deficits.

## Materials and methods

### Animals, diets and insulin treatment

Wistar rats bred in our laboratory with controlled temperatures and an artificial dark-light cycle (light from 07:00 to 19:00) were used throughout this study. Females were caged with males, and mating was confirmed by the presence of spermatozoa in vaginal smears. Each dam was housed individually from the 14th day of pregnancy. Food-restriction was established from the 16th day of pregnancy. Control animals were fed a commercial standard laboratory diet *ad libitum*, containing by weight 19% protein, 56% carbohydrate (starch and sucrose) 3.5% lipid, 4.5% cellulose, a vitamin and mineral mix, and 12% water. Food-restricted animals were subjected to the following dietary pattern: pregnant rats received 10 g daily of the standard food until delivery. Lactating mothers received 15 g daily of this food during the first week of suckling and 20 g daily during the next 3 days. Water was provided *ad libitum*. Food intake of control and undernourished pregnant and lactating mothers has been previously described (Escrivá *et al.* 1992). The number of pups in each litter was evened to eight. Offspring from dams that received a normal diet and those from food-restricted dams were studied at age 10 days. Only females were selected. In an additional set of experiments, the pups were transferred to an incubator (37°C, 70% relative humidity) and starved overnight. Fasted and non-fasted pups were given intraperitoneal injections of insulin (5 i.u./kg, Actrapid, Novo, Copenhagen, Denmark).

The rats were killed by decapitation without anesthesia, blood was harvested from the trunk and plasma was stored at -80°C. For the biochemical analysis, the brains were rapidly removed and placed on a chilled surface. The cerebral cortices were dissected out quickly over ice and kept at -80°C until assays were performed. All animals were handled in accordance with the principles and procedures approved by The Committee for Animal Experimentation of the Universidad Complutense, Madrid.

### Microvessel-enriched and crude membranes preparations

Microvessel-enriched preparations were obtained from cortices as previously described, with minor modifications (Devaskar *et al.* 1991). The cortices (500 mg) were minced and homogenized in Ringer's solution containing 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM Hepes buffer

(pH 7.4), 5 mM glucose and 1% dextran. The homogenate was passed through 80  $\mu$ m nylon meshes. An equal volume of 26% dextran in buffer was added and the sample was then centrifuged at 1000 *g* for 10 min. The pellet was resuspended in the initial buffer and poured through a column containing 0.42–0.60 mm glass beads. After extensive washing, the glass beads were taken from the column and the microvessels attached to them were released by gentle agitation with 0.32 M sucrose. The capillary segments remaining in the supernatant were collected by centrifugation (10 000 *g* for 10 min). The pellet was suspended in 20 mM Hepes pH 7.4, sonicated, assayed for protein concentration and stored frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Crude membranes were prepared from cortices by differential centrifugation. Cortices samples (150 mg) were homogenized in 25 mM Hepes buffer (pH 7.4), 4 mM EDTA, 250 mM sucrose, 8 mM phenylmethylsulfonylfluoride and 10  $\mu$ M leupeptin. The supernatant of a 5000 *g* centrifugation was centrifuged at 150 000 *g* for 2 h. The resulting pellet was resuspended in 20 mM Hepes (pH 7.4), sonicated, assayed for protein concentration and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Preparation of lysates

Cortices (150 mg) were homogenized with a Polytron in 1.5 mL ice-cold lysis buffer, composed of 50 mM Hepes (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium fluoride, 2 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 2 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 2 mM benzamide, 10  $\mu$ M leupeptin, 10  $\mu$ g/mL aprotinin and 2 mM sodium orthovanadate. The homogenate was incubated for 60 min at  $4^{\circ}\text{C}$  with gentle stirring and then centrifuged at 100 000 *g* for 60 min. The supernatants were collected, assayed for protein concentration, aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used.

#### Immunoprecipitation

Lysates containing 500–1000  $\mu$ g proteins were immunoprecipitated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with gentle rotation in presence of 2–5  $\mu$ g of the corresponding primary antibodies, followed by the addition of protein A-agarose (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), GammaBind Plus Sepharose (Amersham GE Healthcare BioSciences AB, Uppsala, Sweden) or antimouse IgG-agarose (Sigma BioSciences, Saint Louis, MO, USA) for the rabbit polyclonal, goat polyclonal and mouse monoclonal antibodies, respectively. After mixing for 2 h the pellets were collected by centrifugation (1000 *g*, 20 s) and the supernatants were discarded. Then, the pellets were washed and saved for western blot analysis.

#### Western blot analyses

The samples (microvessels, membranes, lysates or immunoprecipitates) were subjected to SDS-PAGE on 6.5–10% polyacrilamide gels according to Laemmli (1970). Proteins were then electrophoretically transferred to polyvinilidene difluoride filters (PVDF Protein Sequencing Membrane, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) for 2 h. After transferring, the filters were blocked with 5% non-fat dry milk (for general antibodies) or with 3% bovine serum albumin (for anti-phosphotyrosine antibodies) in tris-buffered saline (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6) followed by incubation with primary antibodies overnight. The PVDF filters were next washed four times for 10 min each time with TBS and 0.1% Tween-20, followed by

1-h incubation with appropriate secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, USA). The PVDF filters were then washed as indicated above and subsequently exposed to an enhanced chemiluminescence reagent (ECL) (Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). The bands were quantified by laser scanning densitometry (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). The presence of linearity between the time of X-ray film exposure and the optical density of the bands was initially ensured. Protein loading was assessed by re-probing the blots with mouse anti-rat  $\beta$ -actin.

#### Cytochemistry and immunohistochemistry studies

Brains were removed and fixed in aqueous Bouin's solution overnight. Following dehydration they were embedded in Paraplast (Paraplast Plus, Labonord, Templemar, France). 10  $\mu$ m thick sections were obtained and mounted on glass slides for cytochemistry and immunochemistry. For glycogen cytochemistry, the sections were stained with periodic acid-Schiff (PAS)-diastase procedure after treatment with dimedone, which blocks aldehyde groups from non-glycogen compounds (Kong *et al.* 2002). Diastase (amylase) cleaves the glycogen to yield soluble sugars that are not stained by the Schiff reagent. We applied this enzyme in separate slides in parallel, which were considered as negative controls of staining. Immunohistochemistry was performed as previously described by Kajihara *et al.* (2001) according to the protocol of the mouse Immunocruz Staining System kit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), with diaminobenzidine as chromogen. For neurons detection an anti-Neu-N mouse monoclonal antibody was used.

#### Antibodies used

Anti-GLUT-1, anti-GLUT-3, anti-caspase 3, anti-active caspase 3, anti-Neu-N (Chemicon, Temecula, CA, USA); anti-insulin receptor  $\beta$  subunit, anti GSK3  $\alpha/\beta$ , anti-phospho tyrosine (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA); anti-phospho GSK3  $\alpha/\beta$ , anti-Akt, anti-phospho-Akt, anti-AMPK $\alpha$ , anti-phospho-AMPK $\alpha$ , anti-phospho-ACC, anti-ERK, anti-phospho-ERK, anti-phospho-p38, anti-JNK, anti-phospho-Bad (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), anti-phospho-JNK, anti-p38, anti-Bcl-xL, anti-Bad, anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology), anti- $\beta$ -actin (Sigma BioSciences, St Louis, MO, USA).

#### Analytic procedures

Glucose was measured in plasma by a glucose oxidase method (BioSystems Reagents and Instruments, Barcelona, Spain). Blood ketone bodies (the sum of 3-hydroxybutyrate plus acetoacetate) were analyzed by the method of Williamson *et al.* (1962). Immunoreactive insulin in plasma was determined by RIA using rat insulin as standard (INCSTAR, Stillwater, MN, USA). The purity of microvessel preparations was assessed by measuring the  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (EC 2.3.2.2) activity (Naftalin *et al.* 1969). To quantify glycogen content, the frozen cortices samples were dissolved in 30% KOH by immersion in boiling water for 1 h. Glycogen was precipitated by the addition of ice-cold absolute ethanol and storing the samples over night at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The resulting pellet from a 1200 *g* centrifugation was redissolved in  $\text{H}_2\text{O}$  and precipitated again with ice-cold ethanol. The purified glycogen was then hydrolyzed to glucose by amyloglucosidase (EC 3.2.1.3) and

the liberated glucose was quantified spectrophotometrically, following the appearance of NADPH in the added presence of hexokinase, MgSO<sub>4</sub>, ATP and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Protein concentration was estimated by the Bradford method (Bradford 1976).

### Statistical analysis

All of the data are reported as the means  $\pm$  standard errors. The difference between two mean values is assessed with *t*-test. For multiple comparisons, significance was evaluated by ANOVA, followed by the protected least significance test.

**Table 1** Body and brain weights, plasma glucose and insulin, blood ketone bodies, cortical protein and glycogen concentrations in control and undernourished 10-day-old rats

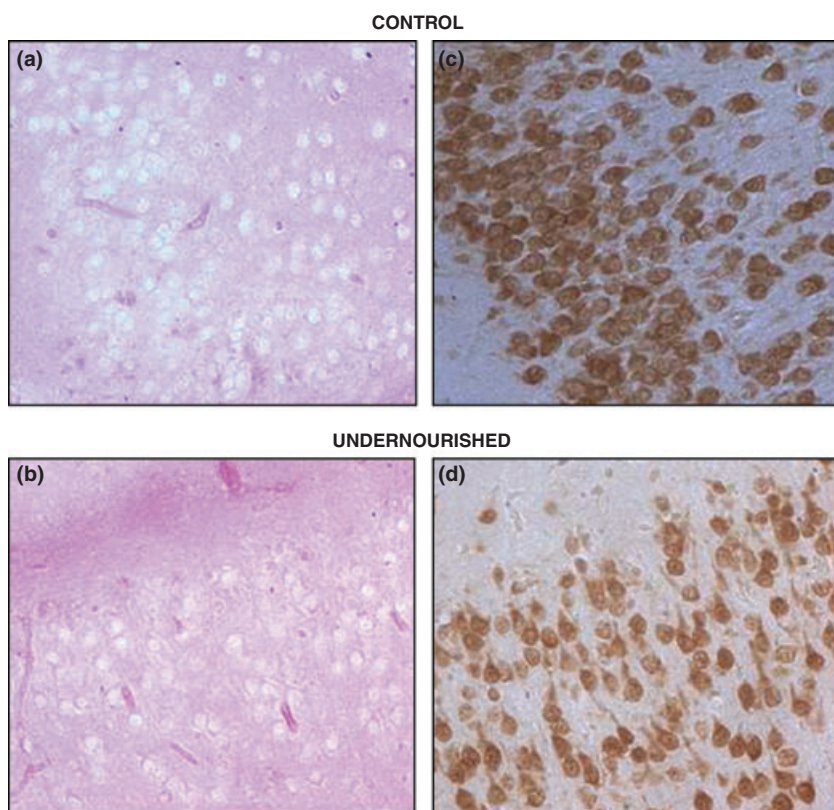
	Control	Undernourished
Body weight (g)	21.9 $\pm$ 0.7	12.3 $\pm$ 0.2***
Brain weight (g)	0.74 $\pm$ 0.06	0.61 $\pm$ 0.05***
Plasma glucose (mg/dL)	144 $\pm$ 3	128 $\pm$ 3***
Plasma insulin (ng/mL)	0.87 $\pm$ 0.14	0.29 $\pm$ 0.06***
Blood ketone bodies ( $\mu$ mol/mL)	0.83 $\pm$ 0.007	1.20 $\pm$ 0.11**
Cortical protein (mg/g)	122 $\pm$ 3	127 $\pm$ 8
Cortical glycogen ( $\mu$ mol/g)	3.5 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 0.2**

Values are means  $\pm$  SE for 6–10 animals in each group. Significant differences between control and undernourished rats: \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.

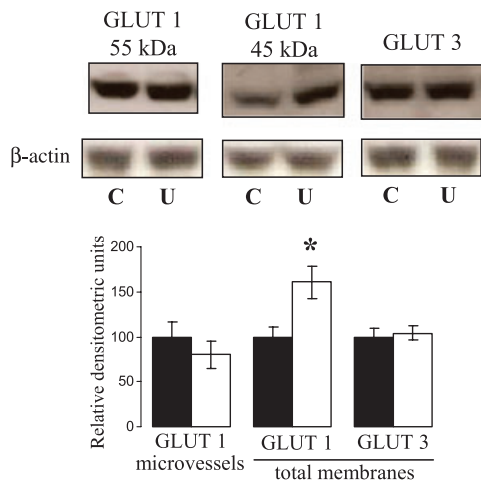
## Results

The characteristics of the two groups of rats studied are summarized in Table 1. The undernourished had 54% and 18% body and brain weight deficits, respectively, in relation to the controls. The brain weight to body weight ratio was greater for the undernourished rats than that for their well-fed controls (4.97  $\pm$  0.11 vs. 3.33  $\pm$  0.07 *p* < 0.001). Plasma glucose concentration in restricted rats was below control value. Undernutrition significantly decreased circulating insulin and increased the blood ketone bodies. We found a marked increase in the glycogen stores present in the cerebral cortex of undernourished rats, 30% above the control values.

To identify which cells store glycogen in the cortex we applied glycogen cytochemistry and immunocytochemistry of Neu-N, a protein only found in neurons. Fig. 1a (control) and Fig. 1b (undernourished) clearly show the stained glycogen, that is largely distributed; also, both microphotographs show many cells in which staining is hardly noticeably. It seems evident that these cells, free of glycogen, morphologically coincide with those revealed by the neuronal marker (Fig. 1c control, and Fig. 1d undernourished). These results demonstrate that glycogen is not localized in the cortical neurons of developing rats, neither in control nor in undernourished pups. Since glycogen had previously been determined by biochemical measurement, no attempts were made to quantify this compound in this cytochemical manner.



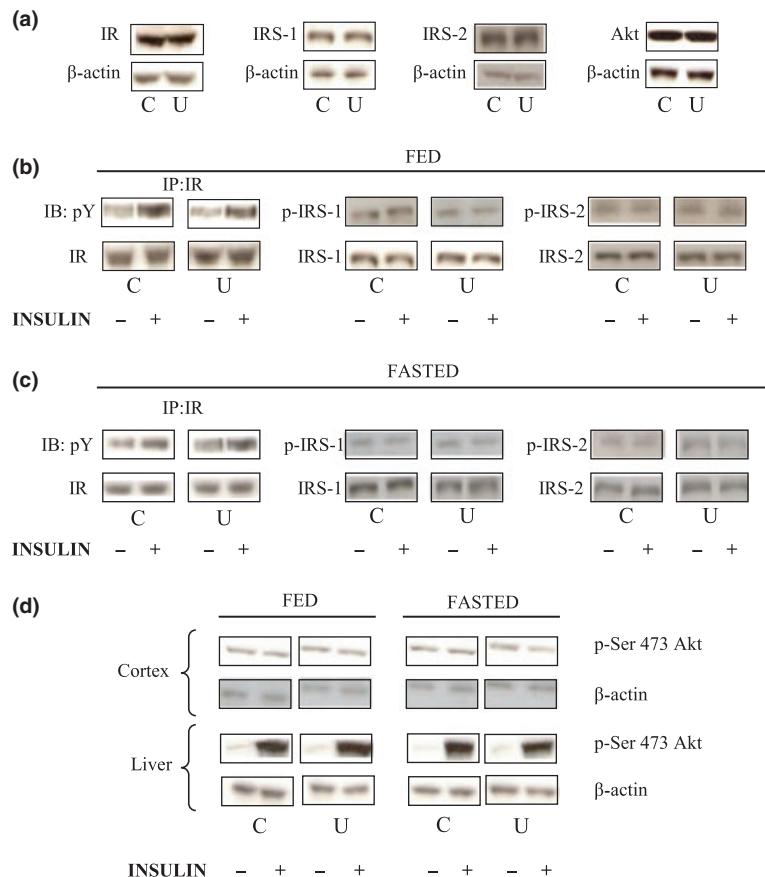
**Fig. 1** Photomicrographs showing diastase-resistant PAS-dimedone staining of glycogen (a and b) and anti-Neu-N immunocytochemistry (c and d) in 10  $\mu$ m sections of cerebral cortex from 10-day-old control (a and c) and undernourished (b and d) rats. Original magnification: 40 $\times$ .



**Fig. 2** Glucose transporter proteins in microvessel and total membrane preparations obtained from cerebral cortex of control (C) and undernourished (U) suckling rats were measured by western blotting. 55 kDa GLUT-1 isoform is only present in microvessels (endothelial cells) whereas both 45 kDa GLUT-1 (astrocytic) and GLUT-3 (neuronal) are found in membrane preparations. Densitometric assessment of bands is expressed as arbitrary units. Each bar represents mean  $\pm$  SE from six to seven determinations. (black bars, controls; white bars, undernourished). Representative blots are shown at top. Differences between control and undernourished rats: \* $p < 0.05$ .

The activity of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (mU/mg protein) was roughly 10-fold higher in microvessel-enriched preparations, compared with those in the initial homogenates:  $7.8 \pm 2.0$  versus  $0.8 \pm 0.08$  for control rats and  $6.6 \pm 2.0$  versus  $0.7 \pm 0.06$  for undernourished. We analyzed GLUT-1 in microvessels and both GLUT-1 and GLUT-3 in crude membranes. The results are shown in Fig. 2. In microvessels the only GLUT-1 isoform detected by western blotting was that of higher molecular weight (55 kDa) which remained unaffected by undernutrition. In total membranes, both GLUT-1 isoform (45 kDa) and GLUT-3 were present but the capillary form of GLUT-1 was too diluted to be detected unless long exposures were made (result not shown). Undernutrition induced a significant increase in 45 kDa GLUT-1 (astrocytic) content but GLUT-3 was not changed.

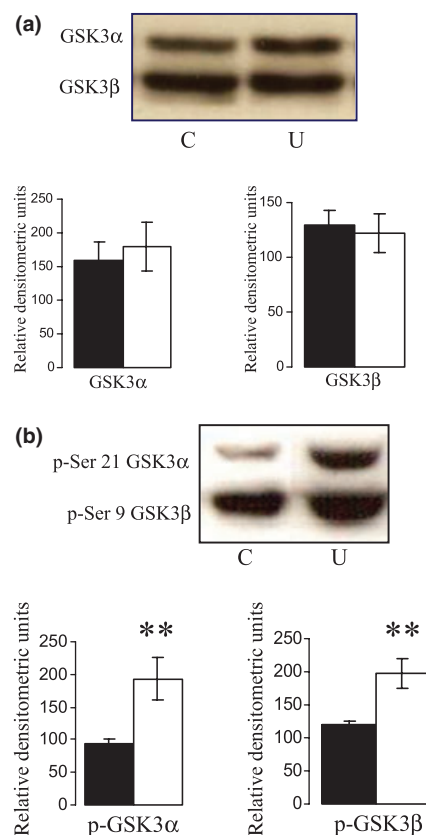
We next analysed the expression of several insulin-signaling proteins in the cerebral cortex: insulin receptor, IRS-1/2 and Akt. There was no difference between undernourished and control rats in the content of these proteins (Fig. 3a). Five minutes after administration of insulin, receptor phosphorylation was equally increased in both groups of animals ( $p < 0.01$ , when comparing with the basal values), irrespective of nutritional condition (fed vs. fasted, Fig. 3b and c). Despite the rise in receptor phosphorylation,



**Fig. 3** Insulin receptor (IR), IRS-1/2 and Akt in the cortex of suckling rats (a). Phosphorylated forms of cortical IR and IRS-1/2 in fed (b) and over night fasted (c) suckling rats in basal condition and after treatment with i.p. insulin or saline, as indicated in Materials and methods. Phosphoser 473 Akt in the cortex and liver of fed and over night fasted suckling rats, in basal condition and after insulin treatment (d). Proteins were analyzed by western blotting. Representative results from six independent determinations are shown for control (C) and undernourished (U) rats.

neither the degree of cortical phospho-IRS-1/2 (Fig. 3b and c) nor that of phospho-Akt (Fig. 3d) were increased over the basal values by hormone treatment, in fed as well as in fasted rats. In contrast, the content of liver phospho-Akt, very low in the basal state, underwent marked increases ( $p < 0.001$ ) following insulin in both groups of rats in the two conditions investigated (fed and fasted), as expected (Fig. 3d) The liver contents of insulin receptor, IRS-1/2 and Akt were not affected by undernutrition (results not shown).

Western blot analysis of GSK3 and phospho-GSK3 proteins showed two bands of different molecular weights, corresponding to  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms, being this latter the most abundant in cerebral cortex. The amounts of both isoforms in undernourished and control rats were comparable, as shown in Fig. 4a. However, phosphorylation of ser21 in GSK-3  $\alpha$  and that of ser9 in GSK-3 $\beta$  were markedly increased by undernutrition, 2- and 1.7-fold respectively, as compared with the control rats (Fig. 4b).



**Fig. 4** Effect of undernutrition on total GSK3 $\alpha/\beta$  (a) and on both, phospho-ser 21 GSK3 $\alpha$  and phospho-ser 9 GSK3 $\beta$  (b) in cerebral cortex of control (C) and undernourished (U) suckling rats, analyzed by Western blotting. Representative blots and the bars from quantitative analysis are shown (black bars, controls; white bars, undernourished). Data are expressed as means  $\pm$  SE of six (for total GSK3  $\alpha/\beta$ ) or ten (for phosphor-GSK3 $\alpha/\beta$ ) independent determinations. Densitometric assessment of bands is expressed as arbitrary units. Differences between control and undernourished: \*\* $p < 0.01$ .

As shown in Fig. 5a, undernutrition did not modify the amount of AMPK present in the cortex. In contrast, this condition led to a significant reduction of AMPK phospho-Thr172. We then examined whether this decrease of activated AMPK affected the phosphorylation of its downstream target ACC (acetyl-CoA carboxylase; EC 6.4.1.2). Not surprisingly, we found that phospho-Ser79 ACC was decreased in the restricted rats, as compared with controls.

Mitogen-activated protein kinases are mediators of growth and development; they play roles in metabolic adaptations to many stress events and are part of the insulin signaling pathways. Thus, we examined the effects of early undernutrition on the three main MAPKs in the cerebral cortex. Neither the content of ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) nor that of p38 MAPK were modified by undernutrition; however, the amount of JNK1/2 (Jun N-terminal kinase) underwent a slight but significant ( $p < 0.05$ ) decrease (Fig. 5b). In the two groups of rats (control and food-restricted), insulin did not increase the extent of phosphorylation in any of the three MAPKs, as compared with the data found in the basal state, irrespective of nutritional condition (fed and over night fasted). The amount of p-JNK 1/2 in undernourished rats remained under control values, the same result seen for this unphosphorylated protein. An outstanding result was that the degree of p38 MAPK phosphorylation (Thr180 and Tyr182) was decreased four-fold by food-restriction ( $p < 0.001$  for all comparisons), in fed as well as in fasted rats (Fig. 5b).

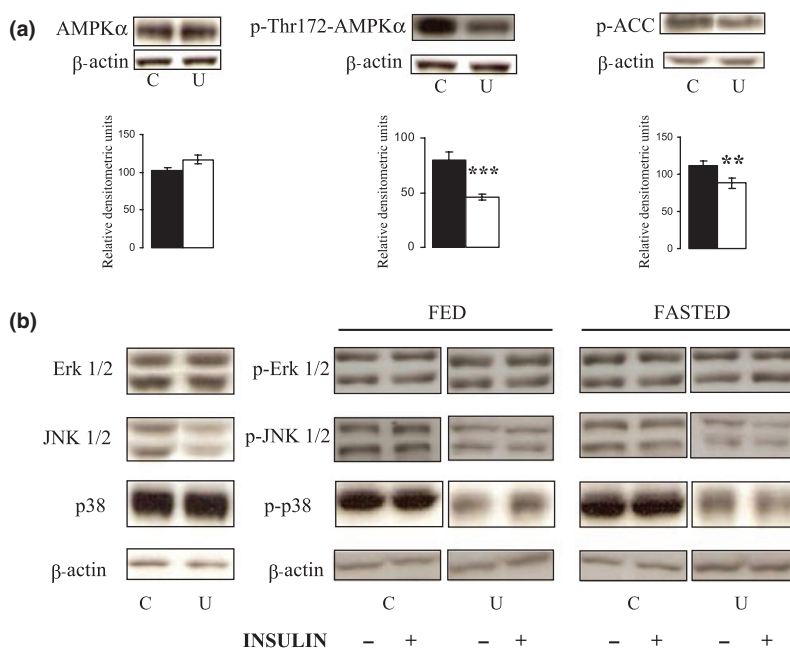
It is known that MAPKs have potential roles in the regulation of apoptosis pathways of many cell types, including neurons and glia. In view of the alterations found in MAPKs we next investigated whether early food-restriction had a repercussion on the cortical cells death/survival, by analyzing several Bcl 2-related proteins and caspase 3, which are directly implicated in apoptosis. As shown in Fig. 6a and b, Western blot revealed that undernutrition had no effects on the contents of both Bcl-xL and Bad, anti- and pro-apoptotic proteins, respectively. However, the abundance of Bax (cell death promoter) and that of phospho-Ser112 Bad were concurrently reduced in the cortex of restricted rats. Finally, we found that neither overall content of pro-caspase 3 nor that of cleaved (active) caspase 3 was affected by undernutrition (Fig. 6c). It must be noted that long exposures of cleaved caspase 3 films were required in all cases, because of the scant amount of such protein present in the analyzed cortex.

## Discussion

### Characteristics of undernourished rats

Undernutrition resulted in an enhanced brain to body weight ratio, indicating a partial preservation of brain growth as compared with the rest of the body. This well-known effect

**Fig. 5** (a) AMPK $\alpha$ , phospho-AMPK $\alpha$  and phospho-ACC quantified in cerebral cortex from control (C) and (U) undernourished suckling rats. Representative results from western immunoblots are shown. Bars correspond to mean  $\pm$  SE of the data obtained from six independent determinations (black bars, controls; white bars, undernourished). The results of densitometry are expressed as arbitrary units. Differences between control and undernourished: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . (b) Total and phosphorylated forms of MAPKs in the cortex from fed and over night fasted suckling rats, in basal condition and after insulin treatment, as indicated in Materials and methods. Results shown are representative of six to eight independent determinations by western immunoblots. C: control; U: undernourished.



of brain sparing is usually considered an adaptation to prevent more severe brain damage, at the expense of visceral organs (Peeling and Smart 1994). Nevertheless, the present study shows that cerebral cortices from restricted rats undergo alterations at the molecular level. On the other hand, undernourished rats are markedly insulinopenic, in accordance with most studies that have shown damage to  $\beta$ -pancreatic function in food-deprived rats (Martín *et al.* 1997). However, these rats are hypoglycemic, which is consistent with the presence of an increased insulin-sensitivity following undernutrition (Gavete *et al.* 2005).

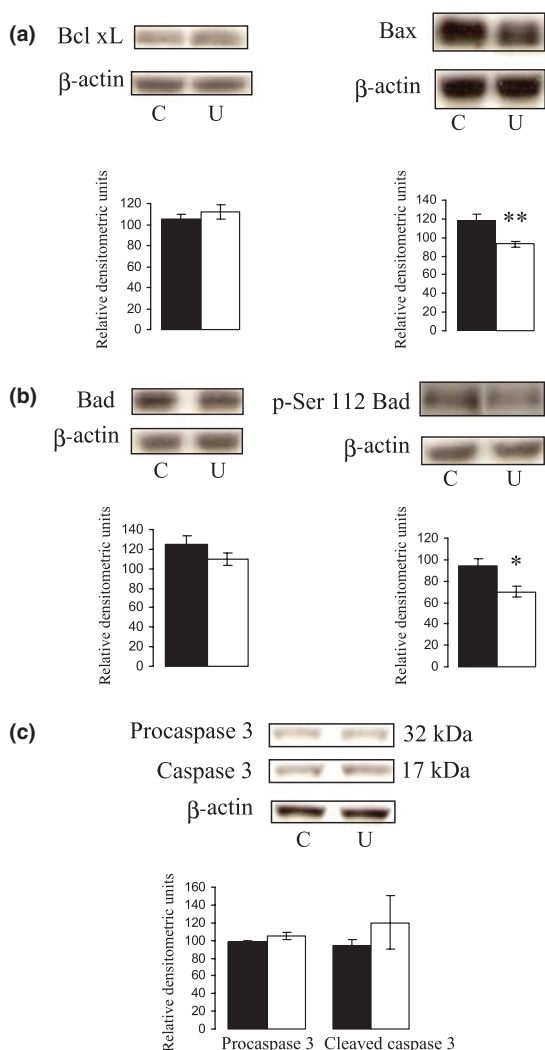
### Glucose transporters and glycogen

Developing brain has a high capacity for ketone metabolism. However, it is also closely dependent upon glucose as energy substrate (Girard *et al.* 1992). The majority of glucose utilized by the brain is mediated by GLUT-1 and GLUT-3 proteins. 55 kDa GLUT-1 is located in microvessel endothelial cells, whereas another less glycosylated GLUT-1 isoform (45 kDa) and GLUT-3 species are present in astrocytes and neurons, respectively (Jope *et al.* 2007). The increase in astrocytic GLUT-1 associated with undernutrition coincides with an increase in cortical glycogen not implicating to neurons, as can be inferred from our histological analysis; both results suggest that the enhanced amount of glycogen following undernutrition is restricted to astrocytes, the predominant glial cells in mammalian brain. It is well-known that brain glycogen is mainly located in these cells. To the best of our knowledge, the present study reports these consequences of perinatal undernutrition for the first time. The physiological role of astrocytic glycogen has not been fully understood. As discussed in the next sections, our data favor the hypothesis that such an increase in glycogen was

mainly caused by an enhanced glycogen synthase activity. However, a reduction in glycogenolysis could also be established, a condition that may lead to a decreased pyruvate and lactate production from glycogen, two important substrates to be transferred from astrocytes to neighboring neurons, cells that have no energy reserves (Dringen *et al.* 1993). On the other hand, astrocytes themselves carry out functions obviously dependent on metabolic energy, such as glutamate synthesis (Gibbs *et al.* 2007), and it is known that both, glycogenolysis and glycolysis are important to fulfill their energy requirements (Hertz *et al.* 2007). Consequently, a reduction in glycogenolysis may also be harmful to astrocytes. Brain glycogen is increased in several pathological states in which neuronal activity is depressed, such as anesthesia and ischemic or traumatic lesions (Phelps 1972; Kajihara *et al.* 2001), which suggests that increased glycogen content could be associated with a reduction in neuronal activity. On the other hand, glycogen seems to be crucial with regard to some higher functions; inhibition of glycogenolysis in astrocytes from neonatal chickens interrupts memory consolidation (Gibbs *et al.* 2006). It has been shown that brain glycogen is implicated in glutamate synthesis by astrocytes (Gibbs *et al.* 2007), as well as in its uptake by both astrocytes and neurons (Sickmann *et al.* 2009). Consequently, the increase in cortical glycogen found in the undernourished suckling rats may have repercussions on glutamatergic activity, which is associated with cognitive processes (Rotta *et al.* 2003).

### Insulin signaling

The cortical amount of insulin receptors, IRS-1/2 and Akt as well as that of the MAPKs extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 were not altered by undernutrition



**Fig. 6** Evaluation of the content of proteins involved in apoptosis in cerebral cortex from control (C) and undernourished (U) suckling rats. Total Bcl-xL and total Bax (a), total Bad and phospho-Bad (b) and both total and cleaved caspase 3 (c) were analyzed by Western immunoblot. The blots shown are representative and the results given as bars are the mean  $\pm$  SE of six-eight separate determinations (black bars, controls; white bars, undernourished). The results of densitometry are expressed as arbitrary units. Differences between control and undernourished groups: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

which, however, resulted in a slight decrease of JNK (discussed later). Basal phosphorylation levels of IRS-1/2, Akt and ERK1/2 were the same when comparing both types of rats (control vs. undernourished), although those of JNK1/2 and p38 were decreased by food-restriction. To verify whether undernutrition was associated to differences in the cortical insulin responses we analyzed the effect of exogenous hormone in food-restricted and control rats. Insulin caused a rapid increase in receptor phosphorylation irrespective of nutritional condition (fed vs. fasted), proving that this

hormone efficiently enters the immature brain from the blood. The increases in receptor phosphorylation were the same in undernourished as in control rats, a finding that rules out differences in this response associated with undernutrition. Surprisingly, despite activation of insulin receptors, the content of phosphorylated forms of all remaining proteins studied was kept at their basal levels in both types of rats, as much in fed as in fasted animals. It indicated that receptor activation does not trigger increases in the phosphorylation of the main insulin signaling transducers, in the short-term analyzed herein. In contrast, a sharp increase in phospho-Akt took place following insulin administration in the liver from both types of rats (control, undernourished), demonstrating marked differences in insulin responses between peripheral and cortical tissues. These results suggest that signal transducer proteins downstream insulin receptor is basally activated in the immature cortex. We are not aware of any report on the *in vivo* effects of insulin in its cortical signaling pathways during development. Clodfelder-Miller *et al.* (2005) have shown that insulin induces a rapid and transient increase in Akt phosphorylation in the cortex of adult fasted mice. The different developmental stage could explain the discrepancy between this result and those found in our study, although differences between animal species cannot be discarded.

#### Effect of undernutrition on cortical GSK3

Insulin induces a net synthesis of glycogen in adult brain (Choi *et al.* 2003) as well as in astrocytes derived from the brain of newborn rats (Dringen *et al.* 1993). It has been shown a direct correlation between astrocytic glycogen content and glycogen synthase activity, the rate limiting enzyme (Allaman *et al.* 2004). Glycogen synthase is a substrate of both GSK3 and AMPK (Wojtaszewski *et al.* 2002; Cammisotto *et al.* 2008) which inactivates this enzyme by phosphorylation. Consequently, we analyzed the content of both kinases and their phosphorylated forms in the restricted and control rats. Our data showed a higher cortical level of GSK3 $\beta$  than GSK3 $\alpha$  isoform, which is well-known, and that their expressions were not affected by undernutrition; however, this condition was associated with a marked increase in their ser-phosphorylation status, a change with inhibitory effects. Phosphorylated, that is, activated AMPK was diminished in the cortex of restricted rats (discussed later). Many studies have shown that the phosphorylated states of both GSK3 and AMPK are retained during the isolation procedures; so, we assume that undernutrition reduces the activities of both kinases. Indeed, we found that acetyl-CoA carboxylase, a substrate of AMPK, was less phosphorylated in the restricted rats. Consequently, it seems likely that both GSK3 and AMP-activated protein kinase (AMPK) up regulate glycogen synthase in the restricted rats, which is consistent with the increased glycogen content found in their cortex. Activated Akt usually appears as a

major mediator of GSK3 ser-phosphorylation but, as previously indicated, we did not find differences in phospho-Akt when comparing both types of rats, control and undernourished. Therefore, the increased phospho-GSK3 seems to be mediated by other events not studied in the present work. Other kinases, such as PKC and PKA, as well as some phosphatases, can modify the degree of phosphorylation of GSK3 (Jope *et al.* 2007) so the possibility arises that its activities may be altered by undernutrition.

The cerebral cortex contains a heterogeneous cell population but, as mentioned, glycogen is essentially located in astrocytes; thus it seems reasonable to conclude that the increase in phospho-GSK3 was mainly occurred in these glial cells. Nevertheless, GSK3 is also expressed in neurons, which opens the possibility that its enhanced phosphorylation may also be produced in these cells. GSK3 is a multifunctional enzyme. Consequently, the down-regulation of this kinase may have repercussions on many proteins and cellular functions of the developing cortex. In fact, dysregulation of GSK3 activity has been seen in several diseases (Jope *et al.* 2007).

#### Effect of undernutrition on cortical AMPK

The function of ser/thr kinase AMPK as a sensor of cellular energy stress has been well established. The major determinant for its activation, allosterically and by phosphorylation, is a drop in cell energy level. Then, AMPK shuts down anabolic pathways and enhances ATP-producing processes. AMPK is highly expressed in the CNS during development (Culmsee *et al.* 2001). It has been recently confirmed that AMPK responds to changes in the energy levels in both cultured cortical neurons (Kleman *et al.* 2008) and astrocytes (Mukherjee *et al.* 2008). Knowing that food deprivation activates AMPK (Kim *et al.* 2004) we investigated whether chronic undernutrition had an impact on this kinase in the brain cortex, finding that this condition resulted in a fall in phospho-AMPK, without changes in total AMPK content. These results may indicate that undernutrition does not induce a shortage of metabolic energy in the developing cerebral cortex. Plasma glucose, the brain's preferred fuel, is decreased in restricted rats but this deficit is slight and probably not sufficient to limit extremely the glucose metabolism. Nevertheless, blood ketone bodies are increased by undernutrition and it is well-known that the immature brain has a high capacity to utilize them (Girard *et al.* 1992). According to Owen *et al.* (1967) ketone body oxidation rises in starvation-induced hypoglycemia. Indeed, undernutrition increases the corresponding brain enzyme activities (Escriva *et al.* 1985). Thus, our findings suggest that cortical ketone body utilization is enhanced in undernourished suckling rats. If it were the case, larger amounts of cortical glucose could be directed to glycogen synthesis in these animals, a possibility which is in accordance with the increased storage found herein. On the other hand, it is known that glycogen

renders AMPK unavailable for activation, when it binds the  $\beta$  subunit of this heterotrimeric kinase (Polekhina *et al.* 2003); consequently, the increased glycogen stores seen in astrocytes from undernourished rats may account for the phospho-AMPK fall found in the whole cortex.

#### Effect of undernutrition on cortical MAPKs and apoptotic proteins

MAPKs are a family of Ser/Thr kinases that regulate many processes associated with cell growth. They are involved in a broad range of events during development of the nervous system: cell survival, apoptosis, proliferation and differentiation (Takeda and Ichijo 2002), as well as in learning and memory (Sweatt 2001). As a first step to elucidate the effects of undernutrition on MAPKs in the cerebral cortex, we studied the three major MAPKs: ERK, p38 and JNK, their content as well as phosphorylation status. Our results showed that undernutrition has no consequence on cortical ERK 1/2 protein expression nor phosphorylation; however, this condition induces some changes in the two other MAPKs analyzed. On the one hand, JNK1/2 and phospho-JNK1/2 are slightly depressed; on the other, phospho-p38 MAPK undergoes a marked reduction. Both JNK and p38 activations mediate neuronal apoptosis, while their specific inhibition is protective, as shown *in vitro* (Xie *et al.* 2004; Yang *et al.* 2007). In order to investigate whether the alterations found in MAPKs have an influence on cell death we next analyzed several proteins involved in apoptosis. The expression of both Bad and Bcl-xL (apoptotic and anti-apoptotic, respectively) remained unchanged in the cortex of restricted rats. Non-phosphorylated Bad interacts with Bcl-xL, thereby promoting the release of the pro-apoptotic factor Bax from Bcl-xL, its translocation to mitochondria and the activation of the caspase cascade. Consequently, Bad phosphorylation constitutes a survival-promoting effect. The content of phospho-Ser112 Bad was reduced in food-restricted rats. This specific phosphorylation, which plays a crucial role in initiating or resisting apoptosis, is catalysed by ERK (Zhu *et al.* 2002). ERK was not altered by undernutrition, suggesting that some specific protein-phosphatase activities (García *et al.* 2003) could be altered by this condition. However, undernutrition led to a concomitant decrease in Bax abundance. Both changes have opposing effects on apoptosis which, as is well-known, depends on the balance of pro- and anti-apoptotic factors. It seems likely that the relative proportion of Bax available to translocate to mitochondria was not altered by early food-restriction.

Apoptosis can be demonstrated in a western immunoblot analysis by measuring the caspase 3 and the abundance of activated caspase 3, the main effector caspase. We found that cortical levels of this activated protein were remarkably low in 10-day-old rats, which rules out a widespread caspase 3-dependent cell death at this specific stage. Our data also

showed that both caspase 3 and cleaved caspase 3 were not modified by undernutrition, indicating that food-restriction was not associated with extensive changes in cortical apoptosis in immature brain tissue. In fact, phospho-Akt, a key regulator of neuronal death/survival, remained unaltered in the restricted rats. Nevertheless, these results do not rule out that undernutrition had a repercussion on the apoptosis of selectively vulnerable subpopulations of cortical cells; these more subtle changes cannot be revealed in the lysates from cerebral cortex analyzed in the present work. On the other hand, our results do not exclude possible consequences of food-restriction on caspase-independent mechanisms of cell loss (Stefanis 2005).

In summary, the results presented herein provide evidence that early undernutrition has effects on the content and/or phosphorylation status of several factors involved in functions that is crucial for the developing cortex. At present, their specific consequences on cerebral functions are not known. However, since these factors regulate many processes, the possibility arises that their alterations disrupt important events characteristic of the growing period and it may be one of the causes of long-lasting damage to the brain. Our experimental approach does not allow us to specify whether these alterations affect glial, neuronal or both types of cells, but it constitutes a step toward fulfilment of this goal.

## Acknowledgments

This work was supported by Grants: BFU2005-02849 and BFU2008-02930 from Ministerio de Ciencia e Innovación; CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM); Proyecto CCG97-UCM/SAL-3004I, Grupo de Investigación Universidad Complutense-Comunidad de Madrid.

## Disclosure statement

The authors have nothing to disclose.

## References

- Allaman I., Pellerin L. and Magistretti J. (2004) Glucocorticoids modulate neurotransmitter-induced glycogen metabolism in cultured cortical astrocytes. *J. Neurochem.* **88**, 900–908.
- Almeida S. S., Tonkiss J. and Galler J. R. (1996) Prenatal protein malnutrition affects exploratory behavior of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol. Behav.* **60**, 675–680.
- Awad N., Gagnon M. and Messier C. (2004) The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and cognitive function. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* **26**, 1044–1080.
- Bedi K. S., Thomas Y. M., Davis C. A. and Dobbing J. (1980) Synapse-to-neuron ratios of the frontal and cerebellar cortex of 30-day-old and adult rats undernourished during early postnatal life. *Comp. Neurol.* **193**, 49–56.
- Biessels G. J. and Gispen W. H. (2005) The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? *Neurobiol. Aging* **26**, 36–41.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Cammisotto P. G., Londono I., Gingras D. and Bendayan M. (2008) Control of glycogen synthase through ADIPOR-1-AMPK pathway in renal distal tubules of normal and diabetic rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **294**, F881–F889.
- Choi I. Y., Seaquist E. R. and Gruetter R. J. (2003) Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism in vivo. *J. Neurosci. Res.* **72**, 25–32.
- Chopra J. S. and Sharma A. (1992) Protein energy malnutrition and the nervous system. *J. Neurol. Sci.* **110**, 8–20.
- Clodfelder-Miller B., De Sarno P., Zmijewska A. A., Song L. and Jope R. S. (2005) Physiological and pathological changes in glucose regulate brain Akt and glycogen kinase synthase 3. *J. Biol. Chem.* **280**, 39723–39731.
- Craft S. (2007) Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment. *Curr. Alzheimer Res.* **4**, 147–152.
- Culmsee C., Monnig J., Kemp B. E. and Mattson M. P. (2001) AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *J. Mol. Neurosci.* **17**, 45–58.
- Devaskar S., Zahm D. S., Holtzclaw L., Chundu K. and Wadzinski B. E. (1991) Developmental regulation of the distribution of rat brain insulin-insensitive (Glut 1) glucose transporter. *Endocrinol.* **129**, 1530–1540.
- Dringen R., Gebhardt R. and Hamprecht B. (1993) Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighbouring cells. *Brain Res.* **623**, 208–214.
- Escobar C. and Salas M. (1995) Dendritic branching of claustral neurons in neonatally undernourished rats. *Biol. Neonate* **68**, 47–54.
- Escrivá F., Rodríguez C. and Pascual-Leone A. M. (1985) Glycemia, ketonemia and brain enzymes of ketone body utilization in suckling and adult rats undernourished from intrauterine life. *J. Neurochem.* **44**, 1358–1362.
- Escrivá F., Rodríguez C., Cacho J., Alvarez C., Portha B. and Pascual-Leone A. M. (1992) Glucose utilization and insulin action in adult rats submitted to prolonged food restriction. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **263**, E1–E7.
- García A., Cayla X., Guergnon J., Dessauge F., Hospital U., Rebollo M. P., Fleischer A. and Rebollo A. (2003) Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2 are key players in apoptosis. *Biochimie* **85**, 721–726.
- Gavete M. L., Martín M. A., Alvarez C. and Escrivá F. (2005) Maternal food restriction enhances insulin-induced GLUT-4 translocation and insulin signalling pathway in skeletal muscle from suckling rats. *Endocrinol.* **146**, 3368–3378.
- Gibbs M. E., Anderson D. G. and Hertz L. (2006) Inhibition of glycogenolysis in astrocytes interrupts memory consolidation in young chicken. *Glia* **54**, 214–222.
- Gibbs M. E., Lloyd H. G., Santa T. and Hertz L. (2007) Glycogen is a preferred glutamate precursor during learning in 1-day old chick: biochemical and behavioural evidence. *J. Neurosci. Res.* **85**, 3326–3333.
- Girard J., Ferré P., Pégurier J. P. and Duée P. H. (1992) Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiol. Rev.* **72**, 507–562.
- Gluckman P. D. and Hanson M. A. (2004) The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol. Metab.* **15**, 183–187.
- Hayakawa M., Okumura A., Hayakawa F., Kato Y., Ohshiro M., Tauchi N. and Watanabe K. (2003) Nutritional state and growth and functional maturation of the brain in extremely low birth weight infants. *Pediatrics* **111**, 991–995.

- Hertz L., Peng L. and Dienel G. A. (2007) Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *J. Cereb. Flow Metab.* **27**, 219–249.
- Ivanovic D. M., Leiva B. P., Perez H. T., Almagia A. F., Toro T. D., Urrutia M., Inzunza N. B. and Bosch E. O. (2002) Nutritional status, brain development and scholastic achievement of children high-school graduates from high and low intellectual quotient and socio-economic status. *Br. J. Nutr.* **87**, 82–92.
- Jope R. S., Yuskaitis C. J. and Beurel E. (2007) Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3): inflammation, diseases and therapeutics. *Neurochem. Res.* **32**, 577–595.
- Kajihara H., Tsutsumi E., Kinoshita A., Nakano J., Takagi K. and Takeo S. (2001) Activated astrocytes with glycogen accumulation in ischemic penumbra during the early stage of brain infarction: immunohistochemical and electron microscopic studies. *Brain Res.* **909**, 92–101.
- Kern W., Peters A., Fruehwald-Schultes B., Deininger E., Born J. and Fehm H. L. (2001) Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinol.* **74**, 270–280.
- Kim E. K., Miller I., Aja S., Landree L. E., Pinn M., McFadden J., Kuhajda F. P., Moran T. H. and Ronnet G. V. (2004) C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMPK-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **279**, 19970–19976.
- Kleman A. M., Yuan J. Y., Aja S., Ronnet G. V. and Landree L. E. (2008) Physiological glucose is critical for optimized neuronal viability and AMPK responsiveness in vitro. *J. Neurosci. Methods* **167**, 292–301.
- Kong J., Shepel P. N., Holden C. P., Mackiewicz M., Pack A. I. and Geiger J. D. (2002) Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. *J. Neurosci.* **22**, 5581–5587.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Liu J. and Raine A. (2006) The effect of childhood malnutrition on externalizing behaviour. *Curr. Opin. Pediatr.* **18**, 565–570.
- Martin M. A., Alvarez C., Goya L., Portha B. and Pascual-Leone A. M. (1997) Insulin secretion in adult rats that had experienced different underfeeding patterns during their development. *Am. J. Physiol.* **272**, E634–E640.
- Mielke K. and Herdegen T. (2000) JNK and p38 stress kinases-degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **61**, 45–60.
- Mukherjee P., Mulrooney T. J., Marsh J., Blair D., Chiles T. C. and Seyfried T. N. (2008) Differential effects of energy stress on AMPK phosphorylation and apoptosis in experimental brain tumor and normal brain. *Mol. Cancer* **7**, 37–51.
- Naftalin L., Sexton M., Whitaker J. F. and Tracey D. (1969) A routine procedure for estimating serum  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity. *Clin. Chim. Acta* **26**, 293–296.
- Owen O. E., Morgan A. P., Kemp H. G., Sullivan J. M., Herrera M. G. and Cahill Jr G. F. (1967) Brain metabolism during fasting. *J. Clin. Invest.* **46**, 1585–1589.
- Park C. R., Seeley R. J., Craft S. and Woods S. C. (2000) Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol. Behav.* **68**, 509–514.
- Peeling A. N. and Smart J. L. (1994) Review of literature showing that undernutrition affects the growth of all processes in the brain to the same extent. *Metab. Brain Dis.* **9**, 33–42.
- Phelps C. H. (1972) Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain. An electron microscopic study. *Brain Res.* **39**, 225–234.
- Plum L., Belgardt B. F. and Brünig J. C. (2006) Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* **116**, 1761–1766.
- Polekhina G., Gupta A., Michell B. J. et al. (2003) AMPK beta subunit target metabolic stress sensing to glycogen. *Curr. Biol.* **13**, 867–871.
- Rotta L. N., Schmidt A. P., Mello e Souza T., Noqueir C. W., Souza K. B., Izquierdo I. A., Parry M. L. and Souza D. O. (2003) Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. *Neurochem. Res.* **28**, 1181–1186.
- Sickmann H. M., Walls A. B., Schousboe A., Bouman S. D. and Waagepetersen H. S. (2009) Functional significance of brain glycogen in sustaining glutamatergic neurotransmission. *J. Neurochem.* **109**, 80–86.
- St Clair D., Xu M., Wang P. et al. (2005) Rates of adult schizophrenia following prenatal exposure to the Chinese famine of 1959–1961. *JAMA* **294**, 557–562.
- Stefanis L. (2005) Caspase-dependent and independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury. *Neuroscientist* **11**, 50–62.
- Susser E., Hoek H. W. and Brown A. (1998) Neurodevelopmental disorders after prenatal famine: the story of the Dutch famine study. *Am. J. Epidemiol.* **147**, 213–216.
- Sweatt J. D. (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.* **76**, 1–10.
- Takeda K. and Ichijo H. (2002) Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells* **7**, 1099–1191.
- Thomas G. M. and Huganair R. L. (2004) MAPK cascade signalling and plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 173–183.
- Tonkiss J., Schultz P. L., Shumsky J. S., Fiacco T. T. A., Vincitore M., Rosene D. L. and Galler J. R. (2000) Chlordiazepoxide-induced spatial learning deficits: dose-dependent differences following prenatal malnutrition. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **65**, 105–116.
- Williamson D. N., Mellanby J. and Krebs H. A. (1962) Enzymic determination of 3-hydroxy-butyrate and acetoacetate in blood. *Biochem. J.* **82**, 90–96.
- Wojtaszewski J. F., Jorgensen S. B., Hellsten Y., Hardie D. G. and Richter E. A. (2002) Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-carboxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle. *Diabetes* **51**, 284–292.
- Xie Z., Smith C. J. and Van Eldik L. J. (2004) Activated glia induce neuron death via MAP kinase signalling pathway involving JNK and p38. *Glia* **45**, 170–179.
- Yang Y., Zhu X., Chen Y., Wang X. and Chen R. (2007) p38 and JNK MAPK, but not ERK 1/2 MAPK, play important role in colchicine-induced cortical neurons apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.* **576**, 26–33.
- Zhen X., Uryu K., Cai G., Johnson G. P. and Friedman E. (1999) Age-associated impairment in brain MAPK signal pathways and the effect of caloric restriction in Fischer 344 rats. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **54**, B539–B548.
- Zhu Y., Yang Y. G., Ahlemeyer B., Pang L., Che X. M., Culmsee C., Klumpp S. and Kriegstein J. (2002) Transforming growth factor beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. *J. Neurosci.* **22**, 3898–3909.

## Undernutrition upregulates fumarate hydratase in the rat nucleus accumbens

E. Lizárraga-Mollinedo · C. Álvarez · E. Fernández-Millán · F. Escrivá · C. González-Martín · E. Salas · J. M. Pérez-Ortiz · L. F. Alguacil

Received: 26 June 2012 / Accepted: 9 November 2012 / Published online: 20 November 2012  
© Springer Science+Business Media New York 2012

**Abstract** Previous comparative studies of fumarate hydratase (FH) protein density revealed that the enzyme was overexpressed in the striatum of rodents that are less influenced by rewarding stimuli, from cocaine to food. Therefore, we recently proposed FH as a potential striatal biomarker of brain reward deficiency and addiction vulnerability. This work has been focused to investigate FH activity in the Nucleus Accumbens (NAc) of undernourished rats, taking into account that malnutrition has been related to increased responsiveness to food and drug reward. To this end, we have studied adult female Wistar rats severely food restricted from the 16th day of intrauterine life until adulthood. Animals were sacrificed to dissect the NAc and obtain mitochondrial and cytosolic fractions after homogenisation and centrifugation. FH activity was

measured by conversion of malate to fumarate, and protein levels were compared by Western blot analysis when fractions showed differences in activity. Undernutrition did not change cytosolic FH activity but led to a marked increase of mitochondrial FH activity (72 %) and protein content (50 %) in the NAc. This change was in the opposite direction that one would predict if it was related to addiction vulnerability of some kind, but strongly suggests that mitochondrial FH needs to be at some optimal level for normal reward responsiveness.

**Keywords** Fumarate hydratase · Malnutrition · Nucleus accumbens · Brain reward

### Introduction

Previous proteomic studies trying to identify biological markers of vulnerability to cocaine addiction revealed that rats showing fast extinction of cocaine-induced place preference (and hence decreased motivation for the drug) differentially overexpressed fumarate hydratase (FH) in the ventral striatum (nucleus accumbens, NAc) (Castillo et al. 2009a). Subsequent work demonstrated that FH was also overexpressed in the striatum of adult male C57BL/6 J mice fed on a high fat diet for 20 weeks from the 4th week of age, a food regime that decreased preference for cocaine-paired stimuli after 8 weeks on high fat. (Alguacil et al. 2011a; Morales et al. 2012). Taken together, these results led us to suggest that FH overexpression in the striatum could be a correlate of reduced reward sensitivity, and hence could behave as a potential biomarker of the so-called “reward deficiency syndrome” (Blum et al. 2000). Presently there is

---

E. Lizárraga-Mollinedo · C. Álvarez · F. Escrivá  
Bioquímica y Biología Molecular, Facultad Farmacia,  
Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

E. Lizárraga-Mollinedo · C. Álvarez · E. Fernández-Millán ·  
F. Escrivá  
CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas,  
ISCIII, Barcelona, Spain

C. González-Martín · E. Salas · J. M. Pérez-Ortiz ·  
L. F. Alguacil (✉)  
Unidad de Investigación Traslacional, Hospital General  
Universitario de Ciudad Real, Obispo Rafael Torija s/n,  
13005 Ciudad Real, Spain  
e-mail: lfallguacil@sescam.jccm.es

C. González-Martín · L. F. Alguacil  
Laboratorio de Farmacología y Toxicología,  
Universidad San Pablo CEU, Boadilla,  
Madrid, Spain

no other behavioral or neurochemical evidence supporting a direct role of FH activity in the regulation of the reward system, therefore further studies are highly recommended to clarify this point. The aim of this work was to progress in this knowledge by studying FH activity in the NAc of undernourished rats, taking into account that perinatal malnutrition has been shown to increase food, morphine and cocaine reward in the adulthood (Tonkiss et al. 1990; Valdomero et al. 2006; 2007). More precisely, we looked at FH to determine if, in a nutritional manipulation predicted to increase sensitivity to reward, FH showed a decrease as might be expected from the high fat diet experiment that reduced reward sensitivity as FH increased.

## Materials and methods

### Animals and diets

All studies were conducted under an approved animal protocol (EC 280790000085) according to the principles and procedures outlined in the Committee for Animal Experimentation of the Universidad Complutense, Madrid. Wistar rats were bred in our laboratory with controlled temperature and artificial dark–light cycle (light from 0700 to 1900), and were fed ad libitum with a commercial standard laboratory diet containing by weight 19 % protein, 56 % carbohydrate (starch and sucrose) 3.5 % lipid, 4.5 % cellulose, vitamin and mineral mix, and 12 % water. Females were caged with males, and mating was confirmed by the presence of spermatozoa in vaginal smears. Each dam was housed individually from the 14th day of pregnancy. We developed a model of severe undernutrition based on the amount of food consumed by control rats, which has been previously described in detail (Escrivá et al. 1992). In summary, restricted rats received 10 g of the standard food daily from 16th day of gestation until delivery, which represents 40–50 % of that ingested by controls and prevents the 20 % increase of body weight observed in these rats during this period. The number of pups was evened out to 8 in all litters after delivery. Next, the restricted mothers received 40 % of the food consumed by controls, that is: 15, 20 and 25 g daily of food during the 1st, 2nd and 3rd week of lactation, respectively. During the period between weaning and 70 days, undernourished rats received 35 % of the diet daily consumed by controls. Water was given ad libitum. We selected the females of each litter for this study.

### Determination of FH activity and protein content in the NAc

Adult control and undernourished rats (70-day-old) were decapitated without previous anaesthesia, the NAc rapidly dissected as described by Heimer et al. (1991), frozen in

liquid N<sub>2</sub> and stored at –80 °C until use. Within a period not exceeding 6 weeks the samples were homogenized in extraction buffer (25 mM sucrose, 0.5 mM EDTA, 10 mM Tris pH 7.4) at 4 °C on ice with a motor-driven Teflon pestle. The subcellular fractionation was performed according to Metzger et al. (2004) with some modifications. After sedimenting the cell debris and nuclei at 600 x g for 5 min, mitochondria were pelleted by centrifuging supernatant at 15,000 x g for 15 min. This pellet was resuspended in the extraction buffer and then subjected to three cycles of 5 s sonication on ice. The 15,000 x g supernatant was centrifuged at 100,000 x g for 1 h and the removed supernatant was considered the cytosolic fraction. The protein content of each fraction was determined by the Bradford method (Quick Start kit, Biorad, California, USA) using bovine serum albumin as the standard. Cytochrome c oxidase was analyzed as a mitochondrial marker (Sottocasa et al. 1967). The cytosolic fraction contained less than 2 % of the cytochrome c oxidase activity measured in the mitochondrial fraction (results not shown). Both fractions were then aliquoted and stored at –80 °C, to avoid repeated freeze-thaw cycles. FH analysis was performed within the first month of storage, using different aliquots of the same sample to assay FH activity and protein content.

FH activity was measured in the direction of L-malic acid to fumaric acid because of the ease of the assay (Tian et al. 2009). After adjusting the protein content of tissue homogenates to 60 µg/ml, a reaction recipe was prepared containing 800 µl of Tris-acetate pH 7.5, 180 µl of L-malic acid (250 mM in Tris-acetate pH 7.5) and 20 µl of the sample. Absorbance at 240 nm was monitored during 2 min at 10 s intervals. FH activity was finally expressed in nmol fumarate / min x mg of protein.

FH protein content was determined by Western blot analysis. After adjusting protein levels to 20 µg/15 µl of PBS, the homogenates were mixed with sample buffer (15 µl; Laemli buffer, Biorad, California, USA) containing β-mercaptoethanol (50 µl/ml of sample buffer), denatured (98 °C, 10 min) and centrifuged. Samples were load into 12 % polyacrylamide gels and proteins were firstly separated by molecular weight and secondly blotted onto polyvinylfluoridine membranes (GE Healthcare, New Jersey, USA) by a wet transfer system (Real, Valencia, Spain). The membranes were treated with blocking buffer (PBS, 0.1 % Tween-20 containing 5 % skimmed milk) for 1 h at room temperature. Afterwards, membranes were incubated with goat primary antibody against FH (Santa Cruz, California, USA; 1:500 dilution) overnight at 4 °C. The membranes were then incubated with donkey anti-goat IgG peroxidase-linked secondary antibody (Santa Cruz, California, USA; 1:2000, 1 h, room temperature), revealed by ECL-Supersignal™ kit following manufacturer's instructions (GE Healthcare, New Jersey, USA) and visualized on

Gel Doc™ XR+(Biorad, California, USA). Developing images were quantified by densitometry (Image Lab software, Biorad, California, USA) and several time exposures were analyzed to ensure the linearity of band intensities. All densitometries are expressed in arbitrary units (A.U.). In all Western blot analyses, actin (Sigma, Missouri, USA; 1:1500 dilution) was used as loading control. Three replicates were used for each sample.

#### Statistics

The results were compared with Student's t-test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

#### Results

As expected, the body weight of restricted rats was markedly lower than that of controls throughout their lives. It was reduced by 20 % and 45 % at birth and weaning, respectively. The weights of undernourished and control adult rats were  $99.4 \pm 2.7$  g and  $188 \pm 3.6$  g ( $p < 0.05$ ), respectively. The brain weight was also lower in the food-restricted adult animals than in controls ( $0.99 \pm 0.02$  g and  $1.26 \pm 0.04$  g, respectively;  $p < 0.001$ ).

FH activity in the NAc did not show significant differences between experimental groups when cytosolic fractions were compared, however it was markedly increased in the

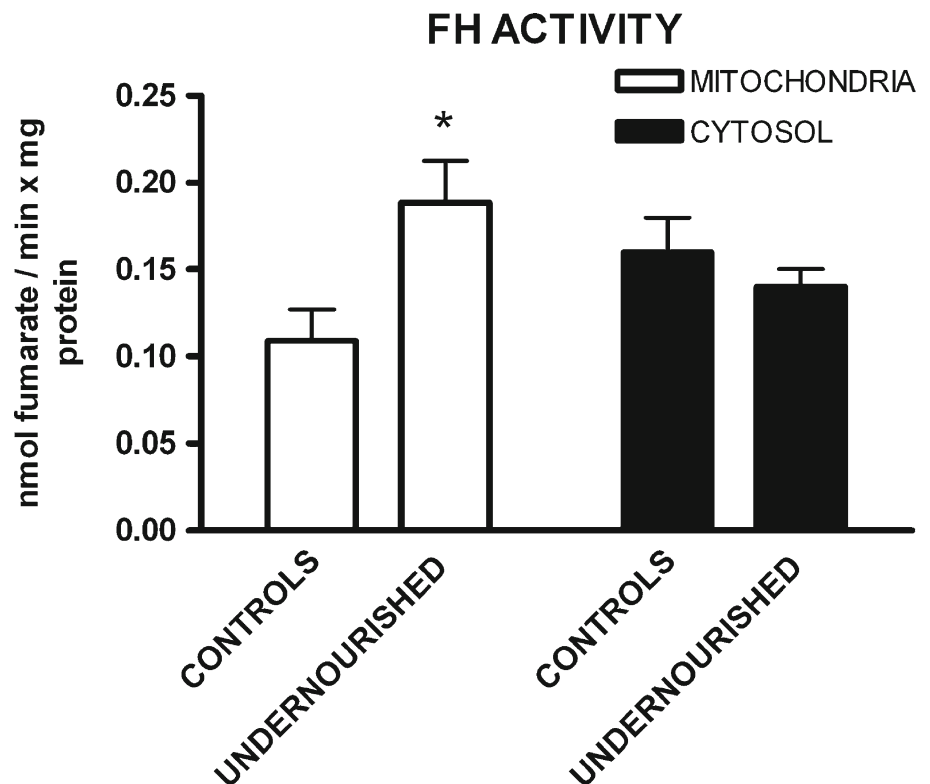
mitochondrial fraction of undernourished rats (Fig. 1). Western blot analysis confirmed a significant over-expression of FH in this fraction (Fig. 2).

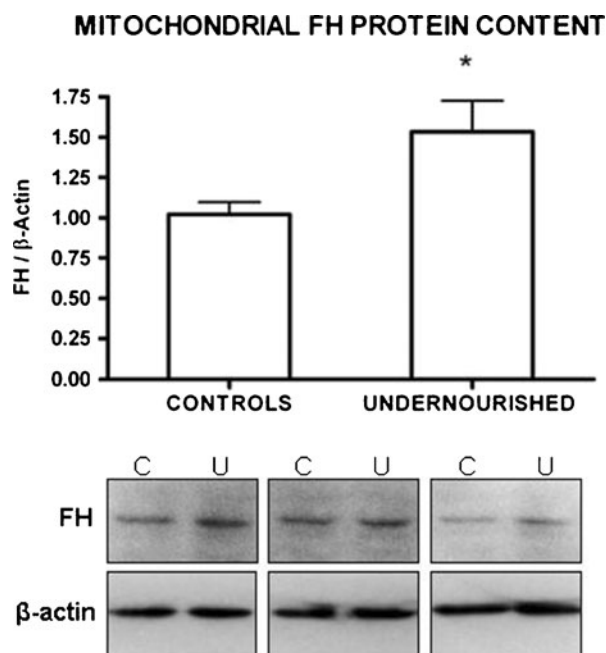
#### Discussion

The experimental procedure used provokes a severe undernutrition as shown by the marked decrease of body and brain weight in restricted animals. The metabolic profile of restricted rats has been extensively described in previous publications. Briefly, they undergo a reduction in the  $\beta$ -cell mass (Martín et al. 1997) which leads to both chronic hypoinsulinemia and poor insulin response to glucose (Escrivá et al. 1992). However, glucose tolerance remains normal (Escrivá et al. 1992), since undernourished rats show insulin hypersensitivity in both liver (Lizárraga-Mollinedo et al. 2012) and peripheral tissues (Gavete et al. 2005). Plasma IGF1 level was reduced in these animals as compared to controls (Fernández et al. 2006). On the other hand, it has been found that glycogen content increases in the cerebral cortex of undernourished suckling rats, which clearly indicates that food restriction has repercussions on central nervous system function (Lizárraga-Mollinedo et al. 2010).

FH is widely known as an enzyme involved in the tricarboxylic acid cycle in the mitochondrial matrix, however it seems to play additional cellular functions in mammals: thus, the enzyme is also found in the cytosol and the nucleus

**Fig. 1** FH activity in cytosolic and mitochondrial fractions of the nucleus accumbens from undernourished rats and their controls. Bars in the graph represent mean values  $\pm$  SEM (\*,  $p = 0.0357$  vs controls)





**Fig. 2** FH protein content in the mitochondrial fraction of the nucleus accumbens from undernourished rats (U) and their controls (C). Bars in the graph represent mean values  $\pm$  SEM (\*,  $p=0.0486$  vs controls). Representative blots of three different determinations are provided

and has been suggested to participate in the urea cycle, the metabolism of amino acids, the repair of DNA damage and the suppression of tumors (Yogev et al. 2011). Interestingly, the main consequences of FH deficiency in humans (a very rare condition) affect the central nervous system, causing brain atrophy with psychomotor retardation and severe neurological impairment in early childhood (Deschauer et al. 2006). Despite these findings there are no studies to our knowledge reporting changes of FH activity in common diseases of the central nervous system.

FH emerged from comparative proteomic studies as a potential marker of vulnerability to addiction, since the protein was overexpressed in the nucleus accumbens of rats exhibiting fast extinction of cocaine place conditioning (Castillo et al. 2009a). Taking into account that obesity has been also associated with decreased sensitivity to psychostimulant reward (Davis et al. 2008; Morales et al. 2012), we further studied FH in the striatum of obese mice to find the enzyme overexpressed again, a finding consistent with the idea that FH overexpression could run parallel to decreases of sensitivity to rewarding stimuli (Alguacil et al. 2011a). The present work tried to further test this hypothesis by testing FH in the NAc of undernourished rats, which were expected to exhibit opposite changes since they are known to be highly sensitive to drug and food reward (Tonkiss et al. 1990; Valdomero et al. 2006; 2007). Surprisingly, we have also found FH overexpression together with a consistent increase of biological activity in the mitochondrial fraction

of undernourished animals, which suggests that mitochondrial FH in the NAc needs to be at some optimal level for normal reward responsiveness.

Even when these results are enough to involve mitochondrial FH activity in reward function, they must be considered preliminary since they also give rise to some important questions that should be addressed with further work on this same animal model. First, one could wonder if FH activity changes are specific and limited to the NAc. Direct experiments are obviously needed to clarify these points; however, previous studies performed in our laboratory are compatible with a specific role of FH in reward function. It must be underlined that only 5 proteins (including FH) were found differentially regulated in the NAc of rats with different rate of extinction of cocaine place preference in baseline conditions, therefore excluding the possibility that protein changes are generalized in these situations (Castillo et al. 2009a). Moreover, FH was the only protein of six initial, strong candidates to addiction biomarkers that could be confirmed in striata from mice showing dissimilar cocaine preference induced by fat consumption (Alguacil et al. 2011a,b). Preliminary evidence also exists that FH differences are absent in the brain cortex of rats and mice with different cocaine seeking behaviors, thus suggesting that these changes could be restricted to areas relevant to reward processing such as the NAc (Castillo et al. 2009b; Alguacil et al. 2010).

A second question applies to the exact mechanisms and functional consequences of mitochondrial FH upregulation. The literature available is not of great help to interpret our findings since the catalytic and regulatory mechanisms of the enzyme have been poorly studied and are not entirely clear up to the date (Mescam et al. 2011), while the biological effects of FH hyperactivity are far less known than those of FH deficiency. This last condition has been consistently linked to disruption of oxidative mitochondrial metabolism but also to other, independent biochemical alterations such as the activation of hypoxia-inducible factor (HIF) (O'Flaherty et al. 2010) and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) (Adam et al. 2011), both of them triggered by fumarate accumulation. Therefore, one could predict that FH hyperactivity could mainly result in enhanced oxidative ATP synthesis and activation of accumbal neurons, but this seems too simplistic on the basis of the present knowledge and needs to be specifically addressed.

In summary, the results obtained in the undernutrition model together with previous findings from cocaine seeking experiments strongly suggest that alterations of brain reward are accompanied by significant changes of mitochondrial FH density and activity in the NAc, and thus this protein could be envisaged as a candidate biomarker of brain reward deficiency. The specificity of these changes remains to be fully corroborated in all the former experimental models by further, brain region-specific studies of both FH and other control

enzymes such as those involved in brain development (i.e. acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, 5'-nucleotidase or  $\beta$ -glucosidase).

**Acknowledgements** This work was supported by Grants ISCIII CP08/00188 and BFU 2011–25420 from Ministerio de Economía y Competitividad, S2010/BMD-2423 from Comunidad de Madrid and CCG97-UCM/SAL-30041 from Universidad Complutense de Madrid. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas is an initiative of ISCIII (Ministerio de Economía y Competitividad). The authors would also like to thank Amelia González López for excellent technical assistance.

## References

- Adam J, Hatipoglu E, O'Flaherty L, Ternette N, Sahgal N, Lockstone H, Baban D, Nye E, Stamp GW, Wolhuter K, Stevens M, Fischer R, Carmeliet P, Maxwell PH, Pugh CW, Frizzell N, Soga T, Kessler BM, El-Bahrawy M, Ratcliffe PJ, Pollard PJ (2011) Renal cyst formation in Fhl1-deficient mice is independent of the Hif/Phd pathway: roles for fumarate in KEAP1 succination and Nrf2 signaling. *Cancer Cell* 20:524–537
- Alguacil LF, Stucchi P, del Olmo N, Herradón G, Ruiz-Gayo M (2010) Biomarkers and drug targets in addiction and obesity. *Eur J Clin Pharmacol* 66:S85
- Alguacil LF, Salas E, González-Martín C (2011a) Identification of new drug targets and biomarkers related to obesity and eating disorders: an approach based on reward deficit and addiction. *Curr Pharm Des* 17:462–470
- Alguacil LF, Stucchi P, Salas E, del Olmo N, Herradón G, González-Martín C, Ruiz-Gayo M (2011b) Fumarate hydratase is upregulated in the striatum of animals with spontaneous and diet-induced inhibition of psychostimulant reward. *Neuroscience Meeting Planner* 688.11/JJ11 Washington, DC: Society for Neuroscience, Online
- Blum K, Braverman ER, Holder JM, Lubar JF, Monastra VJ, Miller D, Lubar JO, Chen TJ, Comings DE. (2000). Reward deficiency syndrome: a biogenetic model for the diagnosis and treatment of impulsive, addictive, and compulsive behaviors. *J Psychoactive Drugs* 32(Suppl:i-iv):1–112
- Castillo C, Morales L, Alguacil LF, Salas E, Garrido E, Alonso E, Pérez-García C (2009a) Proteomic analysis of the nucleus accumbens of rats with different vulnerability to cocaine addiction. *Neuropharmacology* 57:41–48
- Castillo C, Morales L, Salas E, Alguacil LF, Pérez-García C (2009b) Análisis del proteoma de la corteza cerebral de ratas con diferente vulnerabilidad a la adicción a la cocaína. Abstracts XIII Meeting SENC: 149
- Davis JF, Tracy AL, Schurdak JD, Tschöp MH, Lipton JW, Clegg DJ, Benoit SC (2008) Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat. *Behav Neurosci* 122:1257–1263
- Deschauer M, Gizatullina Z, Schulze A, Pritsch M, Knöppel C, Nape M, Zier S, Gellerich FN (2006) Molecular and biochemical investigations in fumarase deficiency. *Mol Genet Metab* 88:146–152
- Escrivá F, Rodríguez C, Cacho J, Álvarez C, Portha B, Pascual-Leone AM (1992) Glucose utilization and insulin action in adult rats submitted to prolonged food restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 263:E1–E7
- Fernández E, Martín MA, Fajardo S, Bailbé D, Gangnerau MN, Portha B, Escrivá F, Serradas P, Alvarez C (2006) Undernutrition does not alter the activation of  $\beta$ -cell neogenesis and replication in adult rats after partial pancreatectomy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E913–E921
- Gavete ML, Martín MA, Alvarez C, Escrivá F (2005) Maternal food restriction enhances insulin-induced GLUT-4 translocation and insulin signaling pathway in skeletal muscle from suckling rats. *Endocrinology* 146:3368–3378
- Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C (1991) Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41:89–125
- Lizárraga-Mollinedo E, Fernández-Millán E, de Miguel-Santos L, Martínez-Honduvilla C, Alvarez C, Escrivá F (2010) Early undernutrition increases glycogen content and reduces the activated forms of GSK3, AMPK, p38 MAPK and JNK in the cerebral cortex of suckling rats. *J Neurochem* 112:123–133
- Lizárraga-Mollinedo E, Fernández-Millán E, de Toro MJ, Martínez-Honduvilla CJ, Escrivá F, Alvarez C (2012) Early undernutrition induces glucagon resistance and insulin hypersensitivity in the liver of suckling rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E1070–E1077
- Martín MA, Alvarez C, Goya L, Portha B, Pascual-Leone AM (1997) Insulin secretion in adult rats than had experienced different underfeeding patterns during their development. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 272:E634–E640
- Mescam M, Vinnakota KC, Beard DA (2011) Identification of the catalytic mechanism and estimation of kinetic parameters for fumarase. *J Biol Chem* 286:21100–21109
- Metzger S, Nusair S, Planer D, Barash V, Pappo O, Shilyansky J, Chajek-Shaul T (2004) Inhibition of hepatic gluconeogenesis and enhanced glucose uptake contribute to the development of hypoglycemia in mice bearing interleukin-1 $\beta$ -secreting tumor. *Endocrinology* 145:5150–5156
- Morales L, Del Olmo N, Valladolid-Acebes I, Fole A, Cano V, Merino B, Stucchi P, Ruggieri D, López L, Alguacil LF, Ruiz-Gayo M (2012) Shift of circadian feeding pattern by high-fat diets is coincident with reward deficits in obese mice. *PLoS One* 7: e36139
- O'Flaherty L, Adam J, Heather LC, Zhdanov AV, Chung YL, Miranda MX, Croft J, Olpin S, Clarke K, Pugh CW, Griffiths J, Papkovsky D, Ashrafian H, Ratcliffe PJ, Pollard PJ (2010) Dysregulation of hypoxia pathways in fumarate hydratase-deficient cells is independent of defective mitochondrial metabolism. *Hum Mol Genet* 19:3844–3851
- Sottocasa GL, Kuylensstierna B, Ernster L, Bergstrand A (1967) An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *J Cell Biol* 32:415–438
- Tian Z, Liu Y, Usa K, Mladinov D, Fang Y, Ding X, Greene AS, Cowley AW Jr, Liang M (2009) Novel role of fumarate metabolism in dahl-salt sensitive hypertension. *Hypertension* 54:255–260
- Tonkiss J, Shukitt-Hale B, Formica RN, Rocco FJ, Galler JR (1990) Prenatal protein malnutrition alters response to reward in adult rats. *Physiol Behav* 48:675–80
- Valdomero A, Bussolino DF, Orsingher OA, Cuadra GR (2006) Perinatal protein malnutrition enhances rewarding cocaine properties in adult rats. *Neuroscience* 137:221–229
- Valdomero A, Velazquez EE, de Olmos S, de Olmos JS, Orsingher OA, Cuadra GR (2007) Increased rewarding properties of morphine in perinatally protein-malnourished rats. *Neuroscience* 150:449–458
- Yogev O, Naamati A, Pines O (2011) Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions. *FEBS J* 278:4230–4242

# Role of endogenous IL-6 in the neonatal expansion and functionality of Wistar rat pancreatic alpha cells

E. Fernández-Millán · J. de Toro-Martín ·  
E. Lizárraga-Mollinedo · F. Escrivá · C. Álvarez

Received: 29 October 2012 / Accepted: 28 January 2013 / Published online: 23 February 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

## Abstract

**Aims/hypothesis** Plasma glucagon concentrations rise sharply during the early postnatal period. This condition is associated with increased alpha cell mass. However, the trophic factors that regulate alpha cell turnover during the perinatal period have not been studied. Macrophage infiltrations are present in the neonatal pancreas, and this cell type releases cytokines such as IL-6. Alpha cells have been identified as a primary target of IL-6 actions. We therefore investigated the physiological relevance of IL-6 to neonatal pancreatic alpha cell maturation.

**Methods** Histochemical analyses were performed to quantify alpha cell mass, replication and apoptosis. Pancreatic *Il6* expression was determined by quantitative RT-PCR. The biological effect of IL-6 was tested in two in vivo rat models of IL-6 blockade and chronic undernutrition.

**Results** Alpha cell mass increased sharply shortly after birth but decreased significantly after weaning. Pancreatic alpha cell proliferation was as high as 2.5% at the beginning of suckling but diminished with time to 1.2% in adulthood. Similarly, alpha cell neof ormation was remarkably high on postnatal day (PN) 4, whereas alpha cell apoptosis was low

throughout the neonatal period. Moreover, *Il6* mRNA exhibited developmental upregulation in the pancreas of suckling rats, with the highest expression on PN2. Neutralisation of IL-6 reduced alpha cell mass expansion and glucagon production. IL-6 staining was detected within the islets, mainly in the alpha cells. Finally, undernourished neonates showed altered alpha cell number and function and delayed appearance of IL-6 in the pancreas.

**Conclusions/interpretation** These data point to a potential role for local IL-6 in the regulation of alpha cell growth and function during suckling.

**Keywords** Alpha cell mass · Glucagon · Interleukin-6 · Maternal food restriction · Pancreas development · Suckling

## Abbreviations

CD68	Cluster of differentiation 68
IL-6Ab	IL-6-neutralising antibody
IL-6R	IL-6 receptor
IUGR	Intrauterine growth retardation
PN	Postnatal day
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
UN	Undernourished

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00125-013-2862-8) contains peer-reviewed but unedited supplementary material, which is available to authorised users.

E. Fernández-Millán · E. Lizárraga-Mollinedo · F. Escrivá ·  
C. Álvarez  
Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y  
Enfermedades Metabólicas Asociadas (ISCIII), Madrid, Spain

E. Fernández-Millán (✉) · J. de Toro-Martín ·  
E. Lizárraga-Mollinedo · F. Escrivá · C. Álvarez (✉)  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II,  
Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid,  
Ciudad Universitaria s/n,  
28040 Madrid, Spain  
e-mail: elfernan@farm.ucm.es  
e-mail: calvarez@farm.ucm.es

## Introduction

The control of glucose homeostasis by the islets of Langerhans depends mainly on the coordinated secretion of glucagon and insulin by alpha and beta cells, respectively. Consequently, the circulating levels of these hormones are determined by the number and function of these two endocrine cell types. There is a large body of evidence indicating that beta cell mass shows considerable plasticity, increasing or decreasing in response to nutrients, hormones and growth factors [1–3]. By contrast, there is scant information

regarding the identity of the signals regulating alpha cell number. Studies have reported that plasma glucagon concentrations rise sharply in humans [4] and rats [5] during the early postnatal period. This condition is associated with an increase in alpha cell mass [6]; however, the trophic factors that regulate alpha cell function and turnover during the perinatal period have not been studied. This time is considered a critical window for endocrine pancreas remodelling [7, 8], and macrophage infiltrations have been observed as a normal feature of fetal and neonatal human [9, 10] and murine pancreas [11]. The functional significance of this macrophage accumulation remains to be elucidated, but it has been suggested that macrophages may participate in postnatal pancreas development because they are able to secrete numerous substances, such as cytokines and growth factors, which are known to be implicated in pancreas regeneration/organogenesis [12].

Cytokines, especially IL-6, merit special attention. In addition to its immunomodulatory effects, several studies have shown that IL-6 has a significant impact on non-immune events, such as glucose homeostasis and metabolism [13]. Indeed, systemically elevated IL-6 levels in obesity are considered a predictive factor for the development of type 2 diabetes [14]. Local islet IL-6 levels are also elevated under conditions of metabolic stress in models of obesity and type 2 diabetes [15], supporting a potential paracrine/autocrine role for IL-6 in the pancreatic islet under these conditions. However, the specific role of IL-6 in the pancreatic islet is still unclear because a potential role for IL-6 in beta cell survival has also been reported [16]. Recently, pancreatic alpha cells have been identified as a primary target of IL-6 actions [17], regulating alpha cell mass expansion and glucagon production and release. However, knowledge concerning the islet cellular origin of this cytokine during physiology is sparse. In investigating this premise in the present study, we found transitory islet-derived IL-6 in the neonatal rat pancreatic alpha cell.

Increasing evidence points to the fact that cytokine production in general, and levels of IL-6 in particular, respond to dietary regulation. In this context, intrauterine growth retardation (IUGR) has been linked to the development of type 2 diabetes in adulthood. The mechanisms underlying this phenomenon are not fully described, but pancreatic beta cell dysfunction and beta cell mass reduction are common findings of studies conducted with nutrition-restricted animal models [18, 19]. However, despite the importance of alpha cells and glucagon secretion in the regulation of glycaemia and nutrient homeostasis, little is known about the contribution of this endocrine cell type to the relationship between poor fetal and early postnatal nutrition and the susceptibility to diabetes later in life. In the present study, using a rat model of maternal undernutrition, which shows altered alpha cell growth and function, we assessed the

physiological relevance of IL-6 to normal pancreatic alpha cell development and its contribution to islet adaptation to nutrient insult.

## Methods

**Animals and diets** Pregnant Wistar rats were used throughout the study. At birth, litters were uniformed to eight pups per nursing dam to minimise the effects of litter size on postnatal growth. The experiments were carried out in at-term fetuses, in neonates on postnatal days (PN) 4, 14 and 23, and in 3-month-old adult rats. All animals were weighed before being killed by decapitation, blood samples were collected and serum was separated and stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pancreases were removed, weighed and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . One series of animals was submitted to food restriction. Pregnant rats received 35% of the standard chow ingested by a control pregnant rat during the third week of gestation and the suckling period. Four to six pups from at least three separate litters were studied at each time point and condition.

All studies were conducted according to the principles and procedures outlined in the National Institute of Health Guidelines for Care and Use of Experimental Animals and approved by the Animal Ethics Committee of the Complutense University of Madrid.

**Immunohistochemistry and morphometry** Immunohistochemistry was performed as previously described [20]. Sections at fixed intervals were incubated with rabbit anti-glucagon antibody (Millipore, Temecula, CA, USA) using the indirect peroxidase method. Alpha cell relative volume was determined by calculating the ratio between the area occupied by glucagon immunoreactive cells and that occupied by total pancreatic cells. Total alpha cell mass per pancreas was derived by multiplying the total pancreatic weight by the alpha cell relative volume. Alpha cell neogenesis was quantified as the number of single alpha cells and alpha cell clusters (two to four) incorporated into the ductal epithelium per  $\mu\text{m}^2$  of the pancreatic area. Results represent the average of five to six sections per animal from four to six animals from each experimental group and age.

Alpha cell apoptosis was estimated by TUNEL assay (ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit; Millipore) coupled to glucagon staining. For alpha cell replication, animals were injected with BrdU 50 mg/kg body weight i.p. (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 1 h before killing. BrdU-positive cells were detected with a cell proliferation kit (GE Healthcare, Amersham, UK). Alpha cell apoptosis or replication rate was expressed as the percentage of apoptotic or BrdU-positive alpha cells, respectively.

For cluster of differentiation 68-positive (CD68+) cell staining, mouse anti-rat CD68 antibody was used (Abcam,

Cambridge, UK). The number of CD68+ cells was counted and expressed per mm<sup>2</sup> of total pancreatic surface area. For pancreatic IL-6/IL-6 receptor (IL-6R) localisation, correlative sections were incubated with the primary antibodies goat anti-mouse IL-6 or rabbit anti-mouse IL-6R (both from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and rabbit anti-human glucagon, and visualisation was carried out using appropriate secondary antibodies coupled to peroxidase or alkaline phosphatase. Specificity of the antibodies against IL-6 and IL-6R was confirmed by isotype controls (goat IgG I-5000 and rabbit IgG I-1000, both from Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

**RNA extraction and quantitative RT-PCR** Total RNA was extracted from frozen pancreas or isolated islets using TRIzol Reagent (Invitrogen, Life Technologies, Madrid, Spain) and reverse transcribed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Life Technologies). Real-time quantitative PCR analyses were performed using TaqMan probes (Applied Biosystems) to determine the relative abundance of *Il6* (Rn01410330\_m1), *Il6r* (Rn00566707\_m1) and *Gcg* (Rn00562293\_m1). The comparative threshold cycle method was used to calculate the relative expression. The target gene values were normalised to the expression of the endogenous reference (18S; Rn01428913\_gH).

**IL-6 neutralisation** Each rat was injected i.p. with 1, 5, 10 or 15 µg neutralising goat anti-rat IL-6 antibody (IL-6Ab; Abcam) or PBS on alternate days immediately after birth until the day they were killed. Serum was collected every other day and IL-6 concentration was determined by ELISA (R&D Systems Europe, Abingdon, UK).

**Islet isolation and culture, and measurement of glucagon secretion and content** Islets were isolated as previously described [19, 21] (electronic supplementary material [ESM] Methods). Glucagon secretion was measured by RIA in isolated islets after exposure to different glucose concentrations (ESM Methods).

**Western blot** Protein samples from islets were prepared as previously described [22], separated by SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) Immobilon membranes and incubated overnight with the corresponding primary antibodies (phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 [STAT3] [Tyr 705]/STAT3 from Cell Signaling Technology, Barcelona, Spain; and IL-6R from Santa Cruz Biotechnology). SaOS-2 and HeLa cell extracts, known to express *Il6r*, were used as positive controls. Immunoreactive bands were visualised using the enhanced chemiluminescence (ECL) western blot protocol

(GE Healthcare). Normalisation of western blot was ensured by β-actin (Sigma-Aldrich), and the intensity of bands was quantified by laser scanning densitometry (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

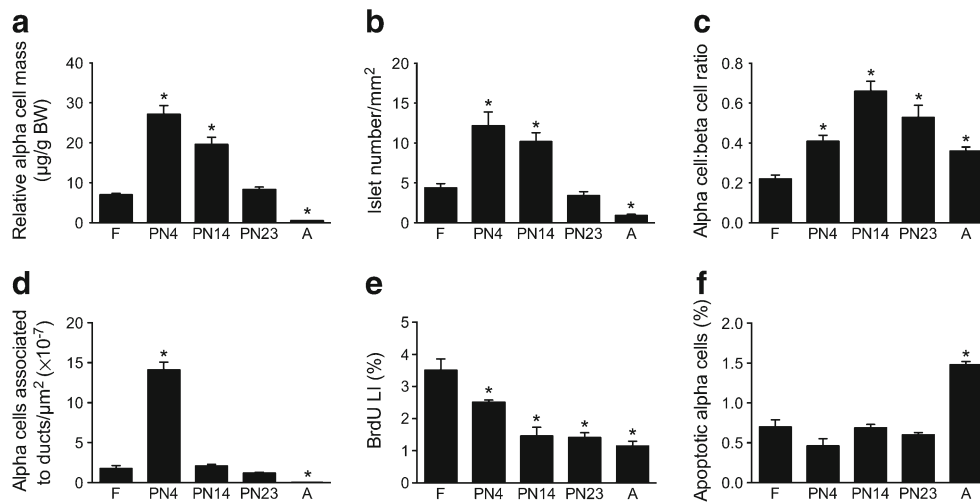
**Analytical determinations** For details, see ESM Methods.

**Statistics** Data are expressed as means±SEM. Significance was tested using Student's *t* test (two-tailed). For multiple comparisons, one-way ANOVA, followed by Tukey's or Tamhane's test, was performed. The level of significance was *p*<0.05. Statistical analysis was performed with SPSS software, version 19.0 ([www.spss.com](http://www.spss.com)).

## Results

**Alpha cell mass increases sharply during suckling** Relative alpha cell mass exhibited a threefold increase from the fetal period to PN4 and then declined progressively with age (Fig. 1a). These structural changes in alpha cells were reflected in circulating glucagon levels (Table 1). The increase in alpha cell mass during suckling was due to alpha cell hyperplasia, not only because islet density was enhanced (Fig. 1b) but also because the alpha cell:beta cell ratio per islet was higher at this time (Fig. 1c). We also observed a significant number of isolated clusters of alpha cells with no contact with beta cells during the neonatal period. These clusters may be a sign of active alpha cell turnover. Therefore, to understand the mechanisms that determine the changes in alpha cell mass that occur with age, we first conducted an estimate of alpha cell neof ormation. We observed that this process notably increased on PN4 and then progressively decreased until reaching undetectable values in adulthood (Fig. 1d). Moreover, the percentage of self-replicating alpha cells diminished with age, being as high as 3.5% at the end of gestation, 2.5% at the start of suckling but only 1.2% in adulthood (Fig. 1e). Finally, the alpha cell apoptosis rate was low throughout the neonatal period but doubled in adulthood (Fig. 1f).

**Neonatal pancreas shows a transitory enhancement of *Il6* mRNA** The above results clearly indicate that the physiological expansion of alpha cells during development follows a different schedule from the one described for beta cells and that other trophic factors are probably involved [7]. Following this premise and because alpha cells have been recently described as primary targets of IL-6 [17], we explored whether the structural changes in alpha cells observed with age were correlated with variations in serum IL-6 levels. However, circulating IL-6 did not show any regulation with



**Fig. 1** Pancreatic alpha cell ontogeny. (a) Relative alpha cell mass under physiological conditions from the fetal period (F) to adulthood (A) expressed as alpha cell mass in µg/g body weight (BW). (b) Islet density. (c) Changes in islet conformation during the first 3 months of age. (d) Alpha cell neof ormation from ducts was evaluated through quantification of single alpha cells and alpha cell clusters (two to four)

incorporated into the ductal epithelium per unit of total tissue area. (e) BrdU labelling index (LI) of alpha cells as a representation of alpha cell replication rate. (f) Alpha cell apoptosis rate. Apoptotic alpha cells were quantified on sections double-immunostained for apoptosis and glucagon. Data are means±SEM ( $n=4-6$  at each age). \* $p<0.05$  relative to F

age under normal physiological conditions (Table 1). By contrast, local pancreatic expression of *Il6* experienced a twofold increase on PN2 compared with fetal values, followed by a subsequent decrease (Fig. 2a). We found a simultaneous and notable accumulation of CD68+ cells (a macrophage transmembrane protein) [23] in perivascular areas, in interlobular connective tissue and in the vicinity of islets throughout the suckling period (Fig. 2b, c). Immunohistochemical analysis revealed no association between pancreatic IL-6 and CD68+ cells. Interestingly, IL-6 staining was detected in the periphery of islets coinciding with glucagon-positive labelling and being highly evident until PN4 but barely detectable afterwards (Fig. 2c). Finally, IL-6R immunoreactivity was observed within islets throughout the suckling period, although staining was weak in the centre of the islet compared with the periphery, suggesting higher levels of IL-6R in alpha cells (Fig. 2d).

*Alpha cell mass expansion was partly reduced after IL-6 neutralisation* To confirm the role of IL-6 during neonatal alpha cell mass expansion, the biological activity of this cytokine was neutralised. Because only neonates that were administered 15 µg IL-6Ab displayed serum IL-6 concentrations below detectable levels throughout the experiment (Fig. 3a), we used this dose for the following experiments.

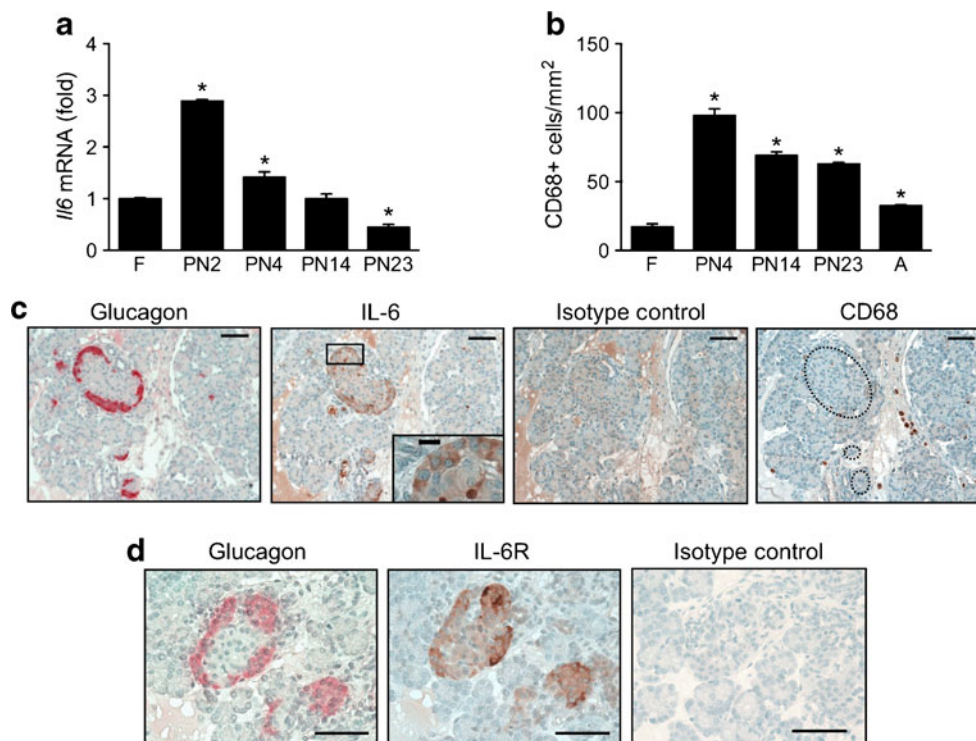
Quantitative RT-PCR showed a 50% reduction in pancreatic *Il6* mRNA levels in PN2 neonates injected with IL-6Ab when compared with those administered PBS (Fig. 3b), together with a significant decrease (33%) in *Gcg* expression (Fig. 3c). In agreement, IL-6 blockade partially reduced (sham 55.6±1.6 µg/g; IL-6Ab 37.2±0.5 µg/g body weight) the relative alpha cell mass increase (Fig. 3d) as well as circulating glucagon levels (sham 397.0±23.2 ng/l; IL-6Ab 110.2±17.9 ng/l) (Fig. 3e) observed in non-treated suckling rats of the same age. These events triggered mild hypoglycaemia in PN2 neonates injected with IL-6Ab (Fig. 3f).

**Table 1** Biological variables in Wistar rats on the last day of gestation (F), during postnatal life and in adulthood (A)

Variable	F	PN4	PN14	PN23	A
Body weight (g)	5.0±0.05	11.8±0.05*	31.2±0.30* <sup>†</sup>	65.4±1.12* <sup>†,‡</sup>	266.5±2.50* <sup>†,‡,§</sup>
Pancreas weight (mg)	19.6±0.40	25.8±0.30*	73.0±4.51* <sup>†</sup>	232.0±6.00* <sup>†,‡</sup>	880.4±17.0* <sup>†,‡,§</sup>
Glycaemia (mmol/l)	2.9±0.23	6.7±0.14*	7.7±0.29*	7.3±0.36*	4.5±0.14* <sup>†,‡,§</sup>
Insulinaemia (pmol/l)	1,170.3±51.6	68.8±5.16*	103.3±10.3*	68.8±17.2*	533.5±17.2* <sup>†,‡,§</sup>
Glucagonaemia (ng/l)	98.7±3.70	458.0±5.50*	533.3±21.0*	114.9±44.0* <sup>†,‡</sup>	89.3±3.70* <sup>†,‡</sup>
Serum IL-6 (pg/ml)	155.2±45.6	207.1±60.7	163.1±51.3	266.7±85.2	167.6±49.8

Data are means±SEM ( $n=3$  litters, 24 animals)

$p<0.05$ : \*relative to F, <sup>†</sup>relative to PN4, <sup>‡</sup>relative to PN14, <sup>§</sup>relative to PN23



**Fig. 2** *Il6* expression profile during pancreas development. (a) Quantitative RT-PCR analysis of *Il6* expression on rat pancreases of different ages normalised for 18S ( $n=4-6$  pancreases at each age). Data are means $\pm$ SEM. \* $p<0.05$  relative to at-term fetuses (F). (b) Number of CD68+ cells in pancreases from rats of different ages (A, 3-month-old adult rats). Cells were counted and expressed per mm<sup>2</sup> of total pancreatic surface area at each age. Data are means $\pm$ SEM (one section per rat and age was analysed;  $n=4$  rats at each age). \* $p<0.05$  relative to F. (c)

Representative images of immunohistochemical localisation of glucagon (red), IL-6 (brown) and CD68 (brown) in serial sections of rat pancreases on PN4. Isotype control staining of IL-6 is indicated. (d) Representative images of immunohistochemical localisation of glucagon (red) and IL-6R (brown) in serial sections of rat pancreases on PN4. Isotype control staining of IL-6R is indicated. Scale bars on large images, 50  $\mu$ m; on inset, 10  $\mu$ m

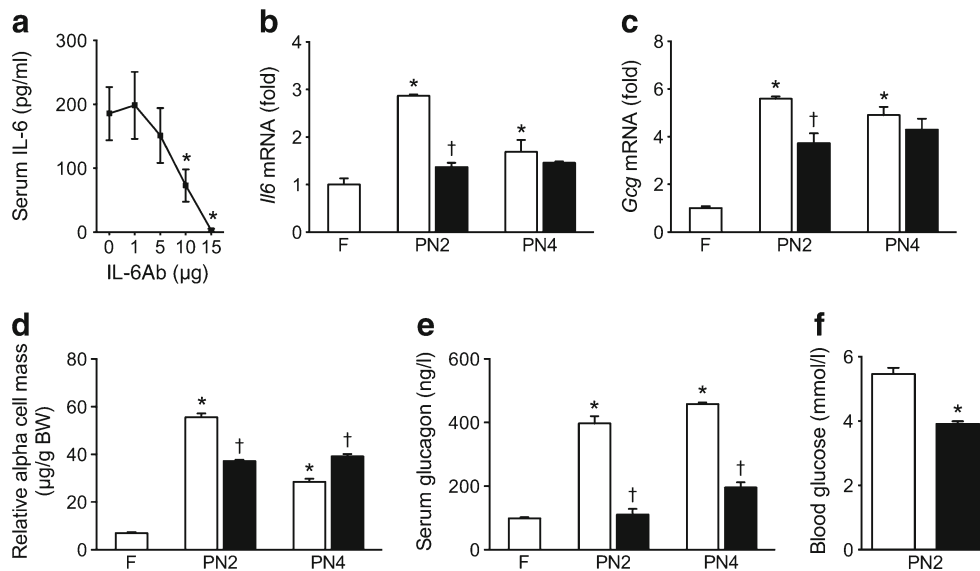
*IUGR disturbs alpha cell growth and function* Maternal food restriction jeopardises the development of the endocrine pancreas, and circulating glucagon has been found to be decreased in undernourished (UN) neonates [22]. We therefore questioned whether UN animals showed altered alpha cell expansion capacity. The assessment of pancreatic alpha cell mass indicated a dramatic reduction in this variable in UN neonates on PN4. However, it was normalised on PN14 and experienced a significant increase at the end of suckling when compared with controls (Fig. 4a). These results could not be explained by changes in the rate of alpha cell replication because quantification of this variable showed defective alpha cell proliferation capacity in UN rats on PN4 and PN14 (Fig. 4b). By contrast, the number of alpha cells associated to ducts was markedly higher on PN14 and PN23 in UN vs controls (Fig. 4c).

To analyse the secretory capacity of alpha cells, isolated islets from PN4 rats were tested in a static assay at different glucose concentrations (Fig. 4d). At a low glucose concentration (0.5 mmol/l), islet alpha cells from control animals showed a characteristic pattern of glucagon secretion that was effectively inhibited by high glucose levels (3 and

21 mmol/l). Nevertheless, the release of glucagon in islets from UN neonates was only 35% of the value observed at 0.5 mmol/l glucose in control islets. Furthermore, alpha cells from UN islets did not respond to the increase in glucose concentration. These alterations seem to be related in part to changes in *Gcg* expression (Fig. 4e) and are reflected by marked hypoglucagonaemia at this age (Fig. 4f).

*Islets from UN neonates show defective IL-6R signalling pathway* To further assess the role of IL-6 on alpha cell expansion, we conducted quantitative RT-PCR analysis of *Il6* in the pancreas of UN rats. Compared with control animals, UN rats showed lower *Il6* mRNA expression at the end of gestation and on PN4 and PN14. However, pancreatic *Il6* expression significantly increased in UN rats at the end of suckling (Fig. 5a). Furthermore, immunostaining of IL-6 also showed delayed detection of this cytokine within islets from UN rats until PN23 (Fig. 5b).

Next, we performed in vitro studies to test the IL-6R signalling pathway in UN rats. When IL-6 binds to its receptor, signals are transduced via activation of STAT3 and extracellular signal-regulated kinase signalling, regulating several

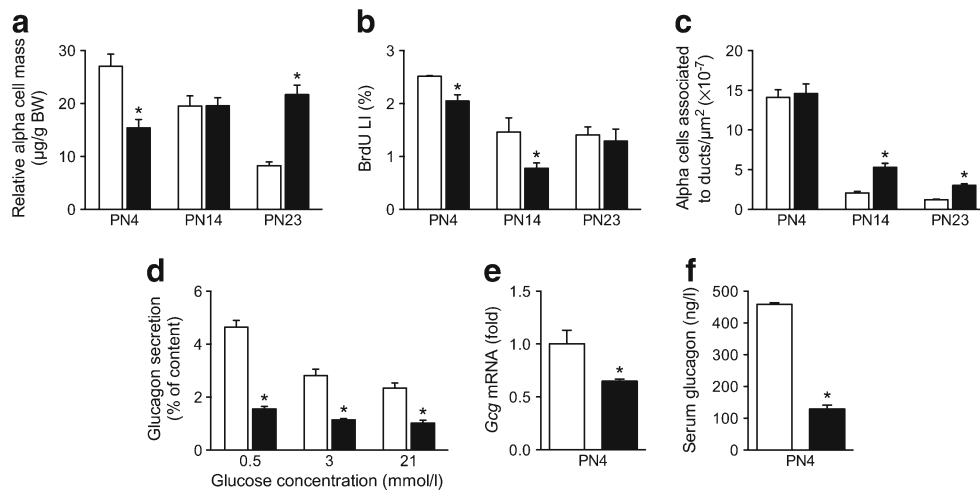


**Fig. 3** Alpha cell mass and serum glucagon levels are reduced after IL-6 neutralisation. **(a)** Serum IL-6 levels after neutralisation. Different doses (1, 5, 10 or 15  $\mu\text{g}$  per rat every 48 h) of IL-6Ab were administered i.p. immediately after birth ( $n=4-5$ ). Data are means $\pm$ SEM. \* $p<0.05$  relative to sham-injected neonates. **(b)** Quantitative RT-PCR analysis of *Il6* expression normalised for 18S on rat pancreases of different ages injected with IL-6Ab or sham-injected ( $n=5-6$  for each condition); F, at-term fetuses. **(c)** Quantitative RT-PCR analysis of *Gcg* expression normalised for 18S on rat pancreases of different ages injected with IL-6Ab or sham-

injected ( $n=5-6$  for each condition). **(d)** Alpha cell mass and **(e)** serum glucagon levels from neonates injected with IL-6Ab or sham-injected ( $n=4-5$ ). **(f)** Serum glucose levels from PN2 neonates injected on PN1 with IL-6Ab or sham-injected ( $n=4-5$ ). Data are means $\pm$ SEM. **(b-e)** \* $\dagger p<0.05$ , determined by ANOVA, where the asterisk compares different ages with the same treatment and the cross symbol compares sham neonates with neonates injected with IL-6Ab at the same age. White bars, neonates injected with sterile PBS (sham); black bars, neonates injected with 15  $\mu\text{g}$  IL-6Ab

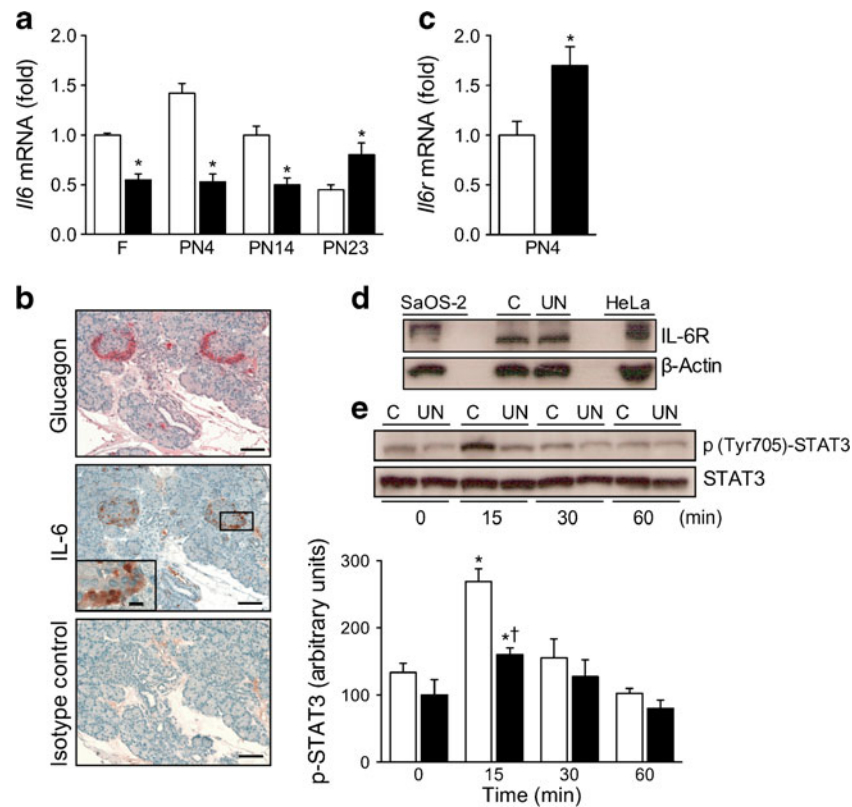
downstream targets. First, we detected higher levels of *Il6r* mRNA in islets from UN neonates compared with controls (Fig. 5c), whereas no differences at the protein level were

observed between groups (Fig. 5d). However, time-dependent phosphorylation of STAT3 was observed after IL-6 treatment of cultured islets. Maximum phosphorylation of



**Fig. 4** Effect of maternal food restriction on offspring pancreatic alpha cell development. **(a)** Relative alpha cell mass expressed as alpha cell mass in  $\mu\text{g/g}$  body weight (BW) in neonatal rats fed ad libitum or UN ( $n=4-6$  in each experimental group and age). **(b)** BrdU labelling index (LI) of alpha cells as a representation of alpha cell replication rate in control and UN neonates ( $n=4-6$  in each experimental group and age). **(c)** Alpha cell neogenesis quantified as single alpha cells and alpha cell clusters (two to four) incorporated into the ductal epithelium per unit of total tissue area ( $n=4-6$  in each experimental group and age). **(d)**

Glucagon secretion in response to glucose from isolated islets of control and UN neonates on PN4 ( $n=8-10$  in each group). **(e)** Quantitative RT-PCR analysis of *Gcg* expression on isolated islets of control and UN neonates on PN4 normalised for 18S ( $n=5$  in each group). **(f)** Serum glucagon levels measured by RIA in control and UN rats on PN4 under 16 h fasting conditions ( $n=8$  in each group). Data are means $\pm$ SEM. \* $p<0.05$ , determined by Student's *t* test comparing control rats with UN rats at each age. White bars, control neonates; black bars, UN neonates



**Fig. 5** Pancreatic islets from UN neonates show a defective IL-6R signalling pathway. **(a)** Quantitative RT-PCR analysis of *Il6* expression on rat pancreases of different ages normalised for 18S ( $n=4$  in each group). Data are means $\pm$ SEM. \* $p<0.05$ , determined by Student's *t* test comparing control rats with UN rats at each age. **(b)** Representative images of immunohistochemical localisation of glucagon (red), IL-6 (brown) and isotype control of IL-6 in serial sections of UN rat pancreases on PN23. Scale bars on large images, 50  $\mu$ m; on insets, 10  $\mu$ m. **(c)** Quantitative RT-PCR analysis of *Il6r* expression on isolated islets of control and UN neonates on PN4 normalised for 18S ( $n=5$ –6

in each group). **(d)** Western blot of IL-6R in cultured islets from control (C) and UN rats on PN4. SaOS-2 and HeLa cell extracts were used as positive controls. **(e)** Time course of STAT3 phosphorylation (P; middle) in the presence of 100 ng/ml IL-6 with its graphical representation ( $n=4$ –6). Data are means $\pm$ SEM. \* $\dagger p<0.05$ , determined by ANOVA, where the asterisk compares different times of stimulation within the same population and the cross symbol compares control values with values obtained in UN islets at the same time. White bars, control neonates; black bars, UN neonates

STAT3 protein was observed at 15 min of IL-6 treatment in both animal groups, although islets from UN neonates showed a very low response (Fig. 5e). No significant change in total STAT3 level was observed due to nutritional manipulation or IL-6 treatment (Fig. 5e). These data suggest that alpha cell/islet IL-6R might be dysfunctional following undernourishment. However, we cannot rule out that IL-6R-induced STAT3-independent signalling pathways could be mediating the transcriptional effects of IL-6 in UN islets.

## Discussion

Our study had four main findings. First, *Il6* mRNA and protein production exhibited developmental regulation in rat pancreas. Second, pancreatic IL-6 localised within the islets, mainly in the alpha cells during the suckling period. Third, short-term IL-6 neutralisation after birth was associated with decreased alpha cell mass and circulating glucagon levels.

Fourth, IUGR disturbs alpha cell growth and function and alters the ontogenetic profile expression of pancreatic *Il6*. These data point to the potential role of local IL-6 for regulation of alpha cell maturation during suckling.

During the perinatal period, important modifications in several physiological functions and, in particular, dramatic changes in nutrition occur. This condition is associated with a remarkable increase in alpha cell mass and hyperglucagonaemia. It has been suggested that the neonatal increase in plasma glucagon may be related to the stress of birth through activation of the sympathetic nervous system that results in the release of catecholamines [24], which are potent stimuli of glucagon release [25]. In addition, catecholamines elevate circulating IL-6 [26, 27], and IL-6 has been proposed as a factor in the increase in alpha cell mass in diabetes [17]. However, our study did not detect any increase in blood IL-6 levels with birth, and to our knowledge it has not been previously reported. By contrast, IL-6 levels exhibited developmental upregulation in the pancreas of newborn rats. Several studies have uncovered IL-6 as a

cytokine that regulates the growth and maturation of developing organs, such as the brain in rats [28] or sheep [29]. Accordingly, the suckling period can be considered a critical window for endocrine pancreas remodelling in rodents [8, 9]. Therefore, our results suggest that there could be an ontogenetic regulatory role for IL-6 in normal neonatal pancreas maturation. Interestingly, our study demonstrates that islet cells represent one of the major sources of IL-6 in the early perinatal period. A predilection of IL-6-positive cells in the periphery of the islet implied a predominant IL-6 production by alpha cells, which was confirmed by staining correlative sections for glucagon. Previous studies have also described pancreatic islet cell production of IL-6 in humans under physiological conditions [30] or in rodent models of obesity and type 2 diabetes [31, 32].

It seems that IL-6 does not exhibit toxicity to alpha cells, because the presence of IL-6R in alpha cells detected by us and others [17] suggests that IL-6 may be involved in the regulation of alpha cell fate during the neonatal period through an autocrine loop. Thus, *in vitro* IL-6 treatment induces alpha cell proliferation [17], and there is some evidence of increased islet cell neogenesis in transgenic mice overexpressing *Il6* in beta cells [33]. In support of this, our study shows an active alpha cell self-replication rate and a remarkable increase in the number of glucagon-positive cells budding from pancreatic ducts soon after birth, coinciding with a high expression of *Il6* in the pancreas.

We cannot ascertain from our temporal measurements whether the changes in *Il6* expression regulate neonatal pancreas development and, thus, subsequent alpha cell maturation. Therefore, to confirm the physiological role of IL-6 during suckling, IL-6Ab was administered to the neonates. IL-6 neutralisation partially reduced alpha cell mass expansion as well as *Gcg* expression. Consequently, suckling rats displayed decreased circulating glucagon levels and hypoglycaemia. This suggests that pancreatic IL-6 is a regulator of neonatal alpha cell growth and function.

It should be noted that lactation is a specific metabolic condition characterised by a milk-based diet. The contribution of milk glucose to the total glucose requirements of the newborn is no more than 10–40% [24]. This implies that new gluconeogenic substrates must be supplied to maintain neonatal glucose homeostasis. Non-esterified fatty acids derived from the high-fat content of milk are excellent oxidative substrates for the liver. Glucagon is the dominant hormone involved in the maturation and regulation of liver gluconeogenesis and fatty acid oxidation [24]. Thus, we suggest that alpha cell mass expansion during suckling is the consequence of a physiological state of increased glucagon demand to ensure the metabolic adaptation of newborns to extrauterine life, and local IL-6 seems to play a positive role in this adaptation. Nevertheless, we cannot rule out that several other factors may also play a role during neonatal

alpha cell expansion, since insulin and IGF-1 receptors are also expressed in islet alpha cells [34, 35].

The injection of a neutralising antibody during the early days of postnatal life represents a limitation in our study in that it restricts us to establishing a cause–effect relationship between the lack of IL-6 and the subsequent reduction in alpha cell mass and function, but it does not let us study the longer-lasting consequences on adult alpha cells. However, both alpha and beta cells from at-term fetuses can be considered as immature in their sensitivity to glucose compared with adult islets [36] and must undergo additional development during the postnatal period. Therefore, all dietary and metabolic events that occur during the perinatal period and the suckling–weaning transition may induce a change in the alpha cells from fetal to adult phenotype with altered glucose thresholds and the ability to release glucagon rapidly. Our data show a continuum in the maturation of glucagon secretion from birth to adulthood in response to glucose (ESM Fig. 1). Hence, any deregulation of these processes due to the abnormal availability of growth factors, such as IL-6, could be of great importance for the correct adult pancreatic physiology and might compromise the alpha cell capacity for adaptation to any later nutritional insult. Likewise, Ellingsgaard et al [17] described normal islet architecture and glucose homeostasis in young adult *Il6* knockout mice under standard fed conditions, suggesting that IL-6 may not be essential for normal alpha cell development. However, after an 18-week high-fat diet, *Il6* knockout animals exhibited glucose intolerance despite decreased fasting glucagon levels and no expansion of alpha cells.

The extensive changes experienced by islet cells throughout neonatal life may render them highly sensitive to any nutritional insult at this time. We and others have previously reported in rodent models that maternal food restriction significantly affects beta cell mass in the offspring neonates [22, 37]. Decreased beta cell mass correlates with hypoinsulinaemia and hypoglycaemia due to increased insulin sensitivity, as we previously demonstrated in our model [38, 39]. In addition, we have observed reduced circulating glucagon levels in suckling pups [22], suggesting that islet adaptations to chronic malnutrition also involve changes in alpha cells. These data prompted us to consider our rat model suitable for further study of the role of IL-6 in pancreatic alpha cell maturation and its contribution to nutritional islet adaptation. In the present work, we describe impaired alpha cell functionality at the level of both glucagon production and secretion in UN neonates. This feature, together with liver glucagon resistance previously reported in our model [38], is associated with marked compensatory alpha cell hyperplasia at the end of suckling. Similarly, alpha cell hyperplasia was observed in animal models in which glucagon signalling had been inhibited either by reduction of glucagon receptor expression [40] or by disruption of proglucagon processing [41, 42]. In both cases, the increase in

alpha cell mass was mainly due to alpha cell replication [41, 43]. By contrast, in the present study, UN neonates showed impaired alpha cell proliferation but enhanced neogenesis.

Interestingly, we also observed a differential expression pattern of pancreatic *Il6* throughout the neonatal period in food-restricted pups compared with controls. Very few and contradictory data exist in the literature regarding the regulation of IL-6 in IUGR subjects. Both reduced [44] and increased [45] fetal IL-6 levels have been documented in IUGR. In our hands, dietary regulation of IL-6 occurred both at the mRNA and protein level, with defective production of the cytokine in the early perinatal period and increased levels close to weaning. These changes in local IL-6 paralleled those observed in relative alpha cell mass, strengthening the argument that IL-6 contributes to alpha cell maturation. However, it would be reasonable to suggest that this differential regulation of IL-6 may influence the risk of developing chronic diseases later in life. Studies are underway to evaluate this possibility and to quantify accurately the dynamic changes in alpha cell population in our IUGR rats fed a high-fat diet.

In summary, using two in vivo rat models of IL-6 blockade and IUGR, we clearly demonstrated in the present study the physiological relevance of local IL-6 for normal neonatal alpha cell mass expansion and functionality. Our results illustrate for the first time that IL-6 exhibits developmental regulation in the rat pancreas. In particular, pancreatic *Il6* expression was enhanced acutely at the beginning of the suckling period and was localised within the islets, mainly in the alpha cells.

Finally, since therapies involving the attenuation of glucagon secretion and action are currently being developed for the treatment of type 2 diabetes, it will be important to determine the nature of the mechanisms and factors involved in alpha cell maturation and function. Accordingly, the suckling period in rodents represents an interesting state of hyperglucagonaemia and alpha cell hyperplasia to explore new targets for therapeutic purposes and to understand how perinatal nutrition determines the development of glucose intolerance in adulthood.

**Funding** This work was supported by Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2011/25420), Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2423) and CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM, ISCIII, Spain). EFM receives support from CIBERDEM.

**Duality of interest** The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

**Contribution statement** All authors contributed to the conception, design, analysis or interpretation of data, and drafting or critical revision of the article for important intellectual content. All authors have given their final approval of the version to be published.

## References

1. Sachdeva MM, Stoffers DA (2009) Meeting the demand for insulin: molecular mechanisms of adaptive postnatal beta-cell mass expansion. *Mol Endocrinol* 23:747–758
2. Nielsen JH, Galsgaard ED, Møldrup A et al (2001) Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors. *Diabetes* 1(Suppl 1):S25–S29
3. Bonner-Weir S (2000) Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metabol* 11:375–378
4. Sperling MA, DeLamater PV, Phelps D, Fiser RH, Oh W, Fisher DA (1974) Spontaneous and amino acid-stimulated glucagon secretion in the immediate postnatal period. Relation to glucose and insulin. *J Clin Invest* 53:1159–1166
5. Girard JR, Cuendet GS, Marliss EB, Kervran A, Rieutort M, Assan R (1973) Fuels, hormones, and liver metabolism at term and during the early postnatal period in the rat. *J Clin Invest* 52:3190–3200
6. Aguayo-Mazzucato C, Sanchez-Soto C, Godinez-Puig V, Gutiérrez-Ospina G, Hiriart M (2006) Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS One* 1:e35
7. Petrik J, Arany E, McDonald TJ, Hill DJ (1998) Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin-like growth factor II that may act as a survival factor. *Endocrinology* 139:2994–3004
8. Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S (1997) Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 138:1736–1741
9. Danilovs JA, Hofman FM, Taylor CR, Brown J (1982) Expression of HLA-DR antigens in human fetal pancreas tissue. *Diabetes* 31:23–29
10. Motojima K, Matsuo S, Mullen Y (1989) DR antigen expression on vascular endothelium and duct epithelium in fresh or cultured human fetal pancreata in the presence of gamma-interferon. *Transplantation* 48:1022–1026
11. Charré S, Rosmalen JG, Pelegri C et al (2002) Abnormalities in dendritic cell and macrophage accumulation in the pancreas of nonobese diabetic (NOD) mice during the early neonatal period. *Histol Histopathol* 7:393–401
12. Homo-Delarche F, Drexhage A (2004) Immune cells, pancreas development, regeneration and type 1 diabetes. *Trends Immunol* 25:222–229
13. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T (2005) Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes* 54(Suppl 2): S114–S124
14. Spranger J, Kroke A, Möhlig M et al (2003) Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)–Potsdam Study. *Diabetes* 52:812–817
15. Ehses JA, Perren A, Eppler E et al (2007) Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 56:2356–2370
16. Choi SE, Choi KM, Yoon IH et al (2004) IL-6 protects pancreatic islet beta cells from pro-inflammatory cytokines-induced cell death and functional impairment in vitro and in vivo. *Transpl Immunol* 13:43–53
17. Ellingsgaard H, Ehses JA, Hammar EB et al (2008) Interleukin-6 regulates pancreatic alpha-cell mass expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:13163–13168
18. Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA (2008) Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J Clin Invest* 118:2316–2324
19. Martín MA, Fernández E, Pascual-Leone AM, Escrivá F, Alvarez C (2004) Protein calorie restriction has opposite effects on glucose

- metabolism and insulin gene expression in fetal and adult rat endocrine pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E542–E550
20. Fernández E, Martín MA, Fajardo S et al (2006) Undernutrition does not alter the activation of beta-cell neogenesis and replication in adult rats after partial pancreatectomy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E913–E921
  21. Fernández E, Martín MA, Fajardo S, Escrivá F, Alvarez C (2007) Increased IRS-2 content and activation of IGF-I pathway contribute to enhance beta-cell mass in fetuses from undernourished pregnant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E187–E195
  22. de Miguel-Santos L, Fernández-Millán E, Angeles Martín M, Escrivá F, Alvarez C (2010) Maternal undernutrition increases pancreatic IGF-2 and partially suppresses the physiological wave of beta-cell apoptosis during the neonatal period. *J Mol Endocrinol* 44:25–36
  23. Holness CL, Da Silva RP, Fawcett J, Gordon S, Simmons DL (1993) Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/lgp family. *J Biol Chem* 268:9661–9666
  24. Girard J, Ferré P, Pégiorier JP, Duée PH (1992) Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiol Rev* 72:507–562
  25. Quesada I, Tudurí E, Ripoll C, Nadal A (2008) Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol* 199:5–19
  26. Houghtling RA, Bayer BM (2002) Rapid elevation of plasma interleukin-6 by morphine is dependent on autonomic stimulation of adrenal gland. *J Pharmacol Exp Ther* 300:213–219
  27. Mohamed-Ali V, Flower L, Sethi J et al (2001) Beta-adrenergic regulation of IL-6 release from adipose tissue: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5864–5869
  28. Pousset F (1994) Developmental expression of cytokine genes in the cortex and hippocampus of the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 81:143–146
  29. Sadowska GB, Threlkeld SW, Flangini A, Sharma S, Stonestreet BS (2012) Ontogeny and the effects of in utero brain ischemia on interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 protein expression in ovine cerebral cortex and white matter. *Int J Dev Neurosci* 30:457–463
  30. Kontogeorgos G, Messini I, Kyrodinou E et al (2002) Immunohistochemical localisation of interleukin-6 in peripheral human endocrine glands. *Endocrine* 17:135–140
  31. Chentouf M, Dubois G, Jahannaut C et al (2011) Excessive food intake, obesity and inflammation process in Zucker fa/fa rat pancreatic islets. *PLoS One* 6:e22954
  32. Ehses JA, Lacraz G, Giroix MH et al (2009) IL-1 antagonism reduces hyperglycemia and tissue inflammation in the type 2 diabetic GK rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13998–14003
  33. Campbell IL, Hobbs MV, Dockter J, Oldstone MB, Allison J (1994) Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice. *Am J Pathol* 145:157–166
  34. Kaneko K, Shirotani T, Araki E et al (1999) Insulin inhibits glucagon secretion by the activation of PI3-kinase in In-R1-G9 cells. *Diabetes Res Clin Pract* 44:83–92
  35. van Schravendijk CF, Foriers A, van den Brande JL, Pipeleers DG (1987) Evidence for the presence of type I insulin-like growth factor receptors on rat pancreatic A and B cells. *Endocrinology* 121:1784–1788
  36. Jermendy A, Toschi E, Aye T et al (2011) Rat neonatal beta cells lack the specialised metabolic phenotype of mature beta cells. *Diabetologia* 54:594–604
  37. Garofano A, Czernichow P, Bréant B (1998) Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat. *Diabetologia* 41:1114–1120
  38. Lizarraga-Mollinedo E, Fernández-Millán E, Martín Jde T, Martínez-Honduvilla C, Escrivá F, Alvarez C (2012) Early undernutrition induces glucagon resistance and insulin hypersensitivity in the liver of suckling rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E1070–E1077
  39. Escrivá F, Rodríguez C, Cacho J, Alvarez C, Portha B, Pascual-Leone AM (1992) Glucose utilization and insulin action in adult rats submitted to prolonged food restriction. *Am J Physiol* 263:E1–E7
  40. Gelling RW, Du XQ, Dichmann DS et al (2003) Lower blood glucose, hyperglucagonemia, and pancreatic alpha cell hyperplasia in glucagon receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1438–1443
  41. Vincent M, Guz Y, Rozenberg M et al (2003) Abrogation of protein convertase 2 activity results in delayed islet cell differentiation and maturation, increased alpha-cell proliferation, and islet neogenesis. *Endocrinology* 144:4061–4069
  42. Furuta M, Yano H, Zhou A et al (1997) Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6646–6651
  43. Vuguin PM, Kedees MH, Cui L et al (2006) Ablation of the glucagon receptor gene increases fetal lethality and produces alterations in islet development and maturation. *Endocrinology* 147:3995–4006
  44. Ødegård RA, Vatten LJ, Nilsen ST, Salvesen KA, Vefring H, Austgulen R (2001) Umbilical cord plasma interleukin-6 and fetal growth restriction in preeclampsia: a prospective study in Norway. *Obstet Gynecol* 98:289–294
  45. Street ME, Seghini P, Fieni S et al (2006) Changes in interleukin-6 and IGF system and their relationships in placenta and cord blood in newborns with fetal growth restriction compared with controls. *Eur J Endocrinol* 155:567–574