

# **PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA**

## **SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE INSULINO- RESISTENCIA EN UN MODELO DE PROGRAMACIÓN FETAL POR ESTRÉS GESTACIONAL**

**Mercado, Alejandro Emiliano– LU:1040554**

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

**Burgueño, Adriana Laura.  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
(BIOMED, UCA-CONICET)**

Co-Tutor:

**Di Rosso, María Emilia,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
(BIOMED, UCA-CONICET)**

**Cámara, María De Los Milagros,  
UADE.**

**Diciembre 19, 2017**



**UADE**

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA  
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero agradecer a Marcela que sin el esfuerzo que junto hicimos nada de esto se podría haber logrado. Gracias Ma te quiero mucho.

También quiero agradecer a Adriana y a Emilia que me dieron la posibilidad de formar parte de un excelente grupo humano y profesional; y también al resto del equipo del laboratorio muchas gracias.

A Ruben que sin sus motivaciones y sus llenadas de cabeza más de una vez me hubiese quedado en el camino, sos mi hermano de otra madre.

A Ana, Facu, Nati, Garibaldi, Cesar, Juli, Mica, Fran y Caro que son los que están siempre sin importa qué, y creen más en mí que yo mismo.

Y por último a todos los que me conocen y la radio esta re buena.

## Resumen

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

En el presente trabajo nos propusimos estudiar si la exposición de ratones C57BL/6J a estrés prenatal (por restricción del movimiento) y a la ingesta de una dieta rica en grasas luego del destete altera su susceptibilidad a desarrollar insulino-resistencia. Además estudiamos si estos tratamientos alteran de la expresión de genes relacionados con la vía inflamatoria en el tejido adiposo.

Encontramos que la exposición a estrés prenatal, ya sea conjuntamente con la ingesta de dieta grasa o no, produjo el desarrollo de sobrepeso, alteraciones en la curva de respuesta a la insulina y niveles de triglicéridos plasmáticos más elevados. En cuanto a la expresión de citoquinas, el estrés prenatal parece contribuir al desarrollo de una respuesta pro-inflamatoria ante una alimentación rica en grasas, evidenciado por un aumento significativo de los niveles de ARNm de IL-6 en tejido adiposo proveniente de estos ratones.

En conclusión, observamos efectos metabólicos deletéreos causados por estrés prenatal sobre la salud de las crías adultas. Además, el desafío metabólico de la dieta rica en grasa evidenció alteraciones metabólicas en estos animales. También se observó un desbalance en la producción de citoquinas pro y anti-inflamatorias entre los diferentes tratamientos. Un mayor conocimiento de las vías implicadas en el impacto del estrés prenatal sobre la insulino-resistencia, considerando tanto procesos inmunológicos como metabólicos, proveerá nuevos enfoques terapéuticos en esta patología.

## Abstract

Given that the intrauterine environment has an important impact on the individual's life, it has been proposed that prenatal stress would have a negative effect on the offspring development, partly due to fetal exposure to high levels of glucocorticoids. In this sense, adverse conditions during early life may cause long-lasting effects on physiology and metabolism, affecting the risk to develop different diseases in the adulthood.

In the present work we studied whether the exposure of C57BL/6J mice to prenatal restraint stress and to the intake of a high fat diet after weaning alters their susceptibility to develop insulin resistance. We also studied if these treatments alter the expression of genes related to the inflammatory pathway in adipose tissue.

We found that prenatal stress exposure, either in conjunction with high-fat feeding or not, led to the development of overweight, altered insulin response, and higher plasma triglyceride levels. As for cytokine expression, prenatal stress appears to contribute to the development of a pro-inflammatory response to a high-fat diet, evidenced by a significant increase in IL-6 mRNA levels in adipose tissue from these mice.

In conclusion, we observed deleterious metabolic effects caused by prenatal stress on the health of adult offspring. In addition, the metabolic challenge of the high-fat diet evidenced metabolic alterations in these animals. An imbalance was also observed in the production of pro and anti-inflammatory cytokines among the different treatments. Greater understanding of the pathways involved in the impact of prenatal stress on insulin resistance, considering both immunological and metabolic processes, will provide new therapeutic approaches in this pathology.

## Contenido

### Agradecimientos 1

Resumen .....	2
Abstract.....	3
Abreviaturas.....	5
Introducción.....	6
Antecedentes.....	7
La programación fetal .....	7
El estrés.....	9
El estrés prenatal.....	10
El rol de los glucocorticoides.....	12
Insulino-Resistencia.....	14
El tejido adiposo, la inflamación y el desarrollo de insulino-resistencia .....	15
Hipótesis .....	21
Metodología.....	22
Animales y diseño experimental.....	22
Preparación de la dieta rica en grasas .....	23
Estrés por inmovilización .....	23
Curva de tolerancia a la glucosa.....	24
Curva de tolerancia a la insulina.....	25
Determinaciones plasmáticas.....	26
Purificación del ARN del tejido adiposo abdominal.....	26
Síntesis del ADN copia.....	27
Evaluación de la expresión génica en tejido adiposo abdominal de citoquinas por Real Time PCR.....	27
Análisis estadístico .....	31
Resultados.....	32
Peso al destete.....	32
Efecto de la dieta y el estrés sobre el peso corporal.....	32
Tolerancia a la glucosa.....	34
Tolerancia a la insulina .....	37
Colesterol total.....	40
Triglicéridos.....	41
Evaluación de la expresión de ARNm de citoquinas en tejido adiposo .....	42
Discusión .....	43
Conclusiones.....	52
Bibliografía.....	53

## Abreviaturas

11 $\beta$ -HSD2	11 $\beta$ -hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 2
ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AGL	Ácidos grasos libres
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CRH	Corticotropina
DC	Dieta control
DG	Dieta grasa
EP	Estresados prenatalmente /Estrés prenatal
GC	Glucocorticoides
GLP-1	Péptido similar a glucagón tipo 1
GR	Receptor de glucocorticoides
HPA	Hipotálamo-pituitario-adrenal
IL-10	Interleuquina 10
IL-1 $\beta$	Interleuquina 1 beta
IL-1R1	Receptor tipo 1 de IL-1
IL-1RA	Antagonista de IL-1R1
IL-4	Interleuquina 4
IL-6	Interleuquina 6
IMC	Índice de masa corporal
M1	Macrófagos tipo 1
M2	Macrófagos tipo 2
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos 1
MTAs	Macrófagos del tejido adiposo
NEP	No estresados prenatalmente
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIBF	Factor bloqueador inducido por progesterona
SI	Sistema inmune
SNS	Sistema nervioso simpático
TAB	Tejido adiposo blanco
TAG	Triacilglicerol
TAM	Tejido adiposo marrón
Th1	Linfocitos T helper 1
Th2	Linfocitos T helper 2
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Células T regulatorias
SVF	Fracción del estroma vascular

## Introducción

En este trabajo se estudió cómo el estrés materno puede afectar la salud futura de las crías en un modelo murino. Para esto, se sometió a estrés por restricción del movimiento a hembras C57BL/6J preñadas entre el día 15 y 21 de gestación. Se eligió esta etapa ya que numerosos trabajos sobre programación fetal demuestran que en este período es cuando los roedores son más sensibles al desarrollo de enfermedades metabólicas (Boersma and Tamashiro 2015; Talge et al, 2007).

Debido a que se ha observado que la cepa C57BL/6J es resistente al estrés, pero es susceptible a desarrollar obesidad al ser alimentada con una dieta rica en grasas, nos propusimos no solo exponer los animales a estrés gestacional, sino que, una vez destetados los alimentamos con una dieta rica en grasas. De este modo detectamos efectos debidos al tratamiento prenatal desencadenados ante el desafío metabólico que implica la ingesta de este tipo de dieta.

Está ampliamente demostrado que uno de los primeros pasos para el desarrollo de insulino-resistencia es la aparición de inflamación, especialmente en el tejido adiposo, que actúa como sitio principal de la misma. Además, se sabe que la ingesta de una dieta rica en grasas causa un estado de inflamación crónico leve. Debido a esto, se decidió estudiar si la expresión de genes inflamatorios en el tejido adiposo de estos animales se ve alterada por los tratamientos recibidos.

### Objetivo general:

Investigar si la exposición a estrés durante la última semana del período prenatal induce alteraciones en la respuesta inflamatoria del tejido adiposo que condicionen el desarrollo de insulino-resistencia. Además, evaluar si esto está relacionado con una expresión diferencial de genes relacionados a la respuesta inflamatoria

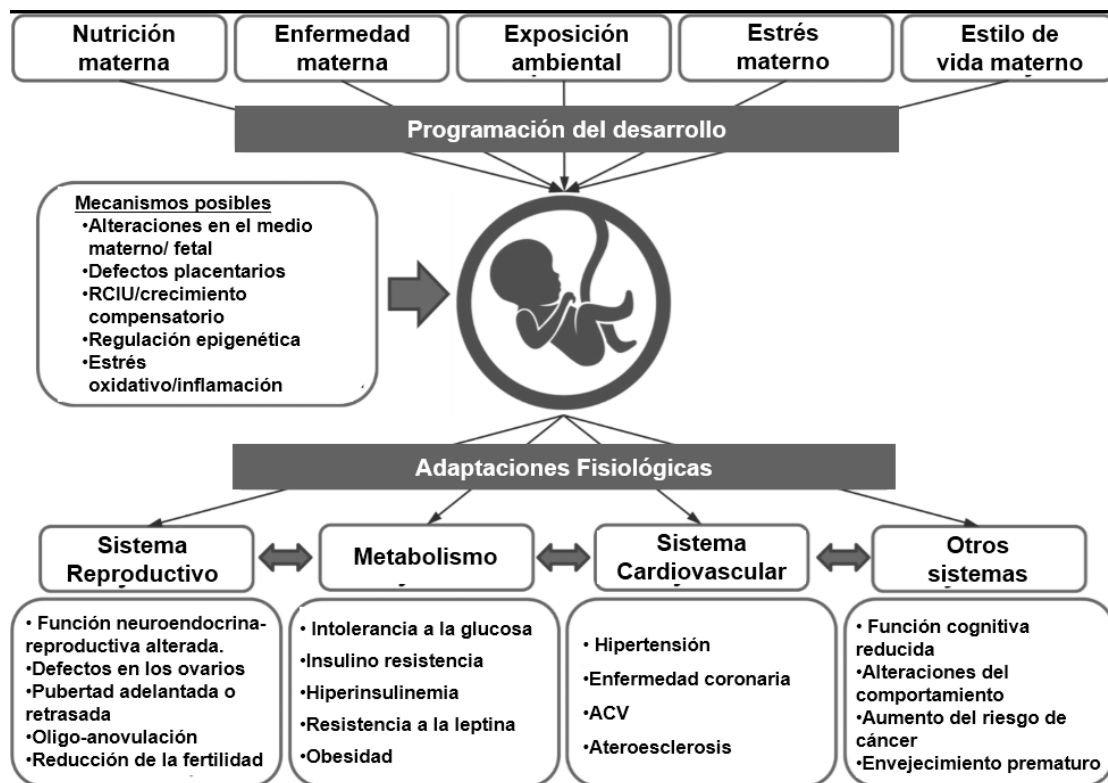
### Objetivos específicos

- 1) Caracterizar el modelo de estrés gestacional, y el efecto de las dietas sobre los tratamientos prenatales en las crías.
- 2) Analizar las modificaciones en la expresión génica de genes involucrados en la inflamación en el tejido adiposo blanco.

## Antecedentes

### La programación fetal

La idea de que lo sufrido durante la gestación tiene consecuencias en la salud del individuo adulto se encuentra enmarcada en la hipótesis del “origen fetal de las enfermedades del adulto” (en inglés “Developmental Origins of Health and Disease”, también denominada “programación fetal”). Esta hipótesis plantea que las condiciones adversas durante los períodos tempranos de la vida pueden resultar en cambios perdurables en la fisiología y el metabolismo, que alteran el riesgo de desarrollar diversas enfermedades en la adultez (figura 1). Esta hipótesis fue propuesta inicialmente por el Dr. David Barker, quien se basó en la observación de que el





bajo peso al nacer estaba asociado con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular en la adultez (Barker and Osmond, 1986).

Figura 1: Representación esquemática de la hipótesis de la programación fetal, se observan los efectos de un medio intrauterino subóptimo y el subsecuente desarrollo de diversas alteraciones metabólicas como hipertensión, insulino-resistencia y obesidad entre otros. (Padmanabhan V, Cardoso RC, Puttabyatappa M. Developmental programming, a Pathway to Disease. *Endocrinology* 2016 Apr;157(4):1328-40)

Evidencias a favor de esta hipótesis provienen de estudios epidemiológicos en individuos que estuvieron expuestos durante su desarrollo a condiciones ambientales desfavorables, como desastres naturales o guerras. Estos estudios muestran un incremento del riesgo de desarrollar desordenes metabólicos, inmunitarios y relacionados al estrés en la adultez. Por ejemplo, niños nacidos durante o inmediatamente después de la hambruna en Holanda (1944-1945) presentaron un mayor riesgo de desarrollar desordenes metabólicos y psiquiátricos (Brown et al, 1995; Franzek et al, 2008; Hoek et al, 1998). Observaciones similares se dieron en los hijos de mujeres gestantes durante la hambruna china (1959-1961) observándose una alta incidencia de esquizofrenia (St et al, 2005). Sin embargo, un estudio realizado en Rusia sobre individuos expuestos a la hambruna en la misma época que en Holanda, no encontró una mayor susceptibilidad al desarrollo de enfermedades metabólicas (Stanner et al, 1997). En contraste con la hambruna holandesa, la rusa persistió hasta que estos individuos llegaron a la adultez, sugiriendo que los desórdenes asociados con el ambiente prenatal pueden quedar latentes y se manifestarán o no según diversos factores a los que será sometido el individuo durante la vida post natal (Nederhof and Schmidt 2012). Durante las últimas décadas más datos avalando esta hipótesis han surgido de estudios tanto en seres humanos como en modelos animales.

Más recientemente, Edwards y colaboradores (Edwards et al, 1993) postularon otra hipótesis que propone que la programación fetal es debida a la sobre-exposición del feto en desarrollo a altos niveles de glucocorticoides (GC). Esta hipótesis fue desarrollada al observar que una menor actividad de la enzima  $11\beta$ -hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 2 ( $11\beta$ -HSD2), llevaba a un incremento en el cortisol que pasa al feto. Esta enzima es de ubicación placentaria y es la responsable (en el ser humano) de la inactivación de cortisol a cortisona. Esta menor actividad enzimática se encontró asociada al nacimiento de animales con

menor peso. Por este motivo, se postuló que esta enzima es la responsable de proteger al feto de los niveles extremadamente altos de GC maternos.

Ambas hipótesis comparten la idea de que la programación fetal lleva a cambios neuroendocrinos que alteran el set-point de los ejes hormonales lo que produce secuelas que se hacen evidentes durante la adultez. Estas hipótesis no son mutuamente excluyentes, al contrario, en reglas generales, una implica a la otra, y la sobre-exposición a los GC se encuentra implicada en ambas (Cottrell et al, 2012). Por ejemplo, se ha visto experimentalmente que la ingesta materna de una dieta baja en proteínas induce hipertensión en las crías, que puede ser prevenida tratando a los animales con un bloqueante de la síntesis de GC (Langley-Evans 1997).

Como se mencionó anteriormente, la exposición a un medioambiente desfavorable durante la gestación puede afectar el peso al nacer. Se ha observado que el bajo peso al nacer es un factor condicionante para presentar un mayor riesgo de padecer diabetes, enfermedad cardiovascular y otros aspectos del síndrome metabólico en la adultez. Algunos autores proponen que el alto peso al nacer presenta los mismos riesgos (Barnes and Ozanne 2011). Estudios epidemiológicos han demostrado que existe una fuerte correlación entre el estrés materno y el peso al nacer (Mulligan et al, 2012). Sin embargo, los trabajos en humanos que estudian los efectos de la exposición a eventos estresantes durante la gestación, como la guerra, poseen infinidad de factores no controlados, siendo los principales los cambios en la disponibilidad del alimento y la variación en la severidad de la exposición tanto dentro como entre estudios.

## **El estrés**

El estrés se define como cualquier situación capaz de perturbar fisiológicamente o psicológicamente la homeostasis. La exposición a situaciones adversas afecta a un importante número de aspectos de nuestra vida diaria (McEwen 1998).

La respuesta al estrés agudo, caracterizada por la activación del sistema nervioso simpático (SNS), del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) y del sistema inmune (SI), es una respuesta adaptativa fisiológica que permite al organismo lidiar con amenazas del medioambiente. Sin embargo, cuando la exposición al estrés es crónica, la activación prolongada de estos sistemas puede tener consecuencias adversas.

Las interacciones homeostáticas finas entre los tres órganos que constituyen el eje HPA controlan las reacciones al estrés y regulan diversos procesos del organismo que van desde la digestión hasta el metabolismo energético (Berthon et al, 2014; Goldstein 2010).

Básicamente, el eje HPA funciona así: las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo secretan el factor liberador de corticotrofina (CRH) que estimula la liberación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) por la hipófisis. La ACTH a su vez promueve la liberación de GC (cortisol en los primates y corticosterona en la mayoría de los roedores) por parte de la corteza adrenal. Los GC producen una retroalimentación negativa tanto sobre la hipófisis anterior como sobre el hipotálamo lo que, en condiciones normales, mantiene los niveles de GC dentro de parámetros normales (Webster et al, 2002)(figura 2).

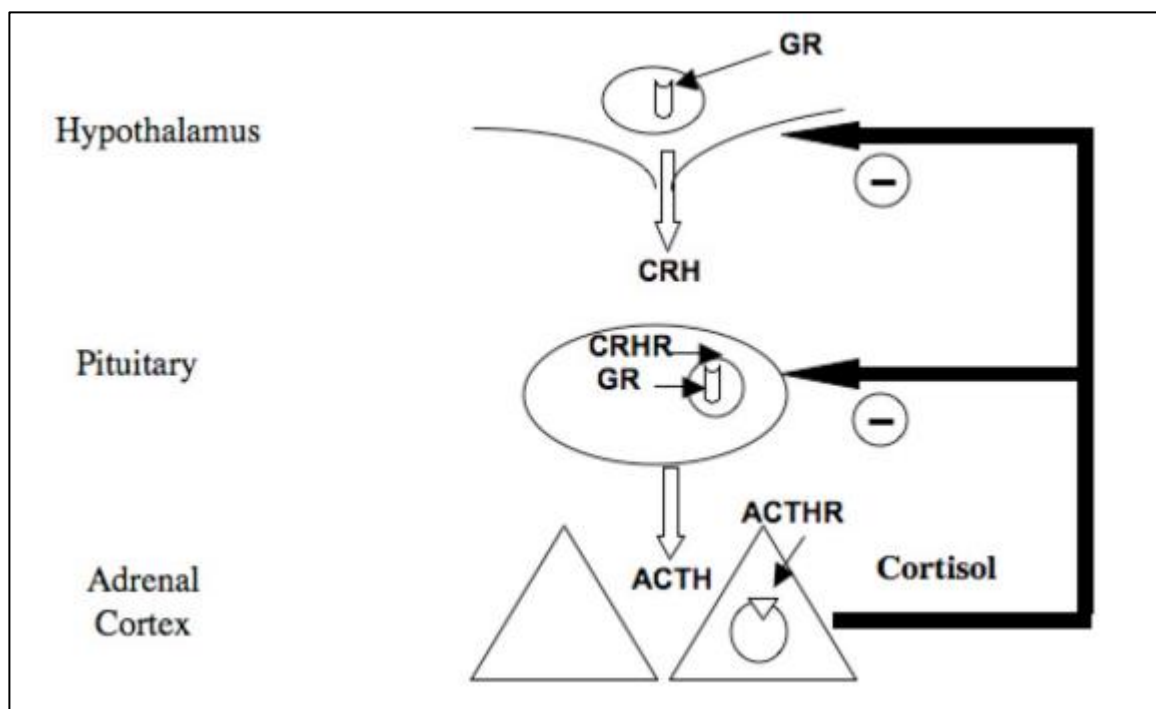


Figura 2: eje Hipotálamo-pituitaria-adrenal, el cortisol ejerce un feedback negativo sobre la secreción hipotalámica de CRH y la de la pituitaria de ACTH, mediante su receptor específico (receptor de glucocorticoides, GR)(Mariana Costanzo MD et al, 2009).

### El estrés prenatal

Dado el importante impacto que tiene el ambiente intrauterino en la vida de un individuo (Barker 1995a; Barker 1995b; Hales and Barker 1992; Jackson et al, 2002) se ha postulado que

el estrés prenatal (EP) tendría un efecto negativo sobre el desarrollo de las crías, en parte como resultado de la exposición del feto a altos niveles de GC.

El estrés crónico durante la adultez puede tener efectos adversos, pero los efectos de la exposición al estrés durante la gestación o la infancia temprana pueden tener consecuencias más severas dado que pueden alterar el desarrollo del cerebro y por lo tanto producir consecuencias en la adultez.

El EP también afecta el fenotipo metabólico de las crías: Lesage y colaboradores han demostrado que el estrés crónico por restricción del movimiento durante la última semana de gestación induce hiperfagia y una alteración de la tolerancia a la glucosa en crías macho adultas de rata (Lesage et al, 2004). Como en el caso de los seres humanos, las crías estresadas prenatalmente presentan menor peso corporal al nacer, lo que puede contribuir a la alteración del fenotipo metabólico más adelante en su vida. Sin embargo, existen estudios en los que se observó una predisposición al desarrollo de un fenotipo similar al síndrome metabólico en ratas a las que se las sometió prenatalmente (durante la última semana de gestación) a un paradigma de estrés variable, pero estos animales no mostraron alteraciones del peso al nacer (Boersma et al, 2014).

Tanto en seres humanos como en animales, el momento de la gestación en el que ocurre el estrés también juega un rol importante. Las consecuencias del estrés dependen del trimestre (o semana en el caso de los roedores) en el que la madre se ve expuesta a él (Talge et al, 2007). El primer tercio de la gestación está caracterizado por un rápido desarrollo de los órganos, por lo que la exposición al estrés durante este periodo produce efectos globales amplios, como por ejemplo problemas cognitivos, malformación cardíaca, sordera y anomalías intestinales y genitales. En el segundo y tercer tercio los órganos se agrandan y especializan, por lo que la exposición a estrés en este periodo produce alteraciones en el peso al nacer y anomalías esqueléticas entre otros (Boersma and Tamashiro 2015; Talge et al, 2007).

La exposición a EP se ha hallado asociada a un elevado riesgo de desórdenes afectivos en humanos (Brown et al, 1995; Watson et al, 1999). Los modelos animales avalan esta asociación presentando un incremento en la incidencia de comportamientos similares a la ansiedad y a la depresión (Morley-Fletcher et al, 2004). Además, ratas estresadas prenatalmente muestran un menor nivel de interacción social (Lee et al, 2007). El EP también ha resultado tener efectos perniciosos a nivel cognitivo y causar desórdenes del desarrollo neurológico. Además, se han

observado respuestas asociadas al desarrollo de un fenotipo similar a la esquizofrenia (Koenig et al, 2005).

La exposición a EP parece alterar los niveles de corticosterona a lo largo del ciclo circadiano; en ratas macho adultas se ha observado que hay un incremento de esta hormona al final de la fase de luz, momento en el que se observan típicamente los niveles más elevados (Koehl et al, 1999). Consistentemente con esto, se ha observado una hipertrofia de las glándulas adrenales (Lemaire et al, 2000). También se encontró una disminución del feedback negativo del eje HPA luego de un estrés agudo. En el cerebro, se han observado alteraciones en el sistema de los GC, con disminución de la capacidad de unión de los receptores de mineralocorticoides y de GC (Koehl et al, 1999; Maccari et al, 1995).

El estrés es un factor de riesgo para el desarrollo de síndrome metabólico debido a la alteración del eje HPA (Vanitallie 2002). Las alteraciones inducidas por el estrés sobre el cerebro en desarrollo (tanto durante la etapa pre como postnatal pueden tener consecuencias en la adultez, resultando en un incremento del riesgo de padecer enfermedades crónicas tanto metabólicas como mentales (Gudsnuk and Champagne 2012).

Con el fin de entender los mecanismos subyacentes de la exposición al EP se necesitan estudios con un mejor control de factores que pueden generar confusión presentes en los estudios epidemiológicos. Un mayor control de los factores ambientales se puede obtener a partir del uso de modelos animales. Los modelos más difundidos de EP consisten en el uso de estrés por restricción del movimiento o estrés crónico variado. Sin embargo, hay algunos estudios que se han enfocado en el estrés social usando un paradigma de derrota social.

### **El rol de los glucocorticoides**

Los GC son moléculas lipofílicas, que cruzan fácilmente la placenta, juegan un papel esencial en la regulación del crecimiento fetal, el desarrollo del cerebro y la maduración de los órganos para preparar al feto para la vida extrauterina. De hecho, durante la gestación los niveles de cortisol aumentan en forma paralela a la maduración de los órganos fetales (Smith and Shearman 1974). Además, el incremento del cortisol materno produce un aumento de la disponibilidad de glucosa para el feto, movilizando sustratos para la gluconeogénesis hepática (Reynolds and Walker 2003). Sin embargo, los niveles de glucocorticoides fetales son

aproximadamente 10 veces menores que los maternos debido a la acción de la 11 $\beta$ -HSD2 (11 $\beta$ -hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 2) (Edwards et al, 1993).

En ratones, la exposición a EP durante la gestación aumenta los niveles de GC en la madre y en el líquido amniótico (Abdul Aziz et al, 2012; Misdrahi et al, 2005).

Se ha observado que la administración exógena de GC durante la gestación produce la alteración del eje HPA, de un modo similar a lo observado en ratas sometidas a estrés gestacional (Drake et al, 2007). Las crías de madres tratadas con dexametasona presentan bajo peso al nacer (Abildgaard et al, 2014) y mayor peso corporal al ser alimentadas con una dieta rica en grasas (O'Brien et al, 2008). Algunos autores han reportado observar alteraciones pre-diabéticas como intolerancia a la glucosa, insulino-resistencia a nivel hepático y aumento de los niveles de glucosa basal en machos provenientes de madres bajo este tratamiento (Buhl et al, 2007; Nyirenda et al, 1998; O'Regan et al, 2004). Esto sugiere que la exposición a GC durante la gestación puede ser de hecho la responsable del aumento del riesgo de padecer problemas metabólicos en las crías sometidas a EP.

Existe evidencia que muestra que la administración de GC a mujeres con riesgo de sufrir parto prematuro tiene efectos adversos sobre la salud metabólica de sus hijos: presión arterial elevada a los 14 años de edad (Doyle et al, 2000) y altos niveles de insulina a los 30 años (Dalziel et al, 2005). El incremento de los GC endógenos, mediante la disminución de la actividad de la enzima 11 $\beta$ -HSD2, está asociada con un aumento de la presión arterial a los 3 años de edad (Huh et al, 2008). Los niveles de cortisol maternos durante la gestación son directamente proporcionales a la grasa corporal en las niñas de 5 años de edad y e inversamente proporcionales en los niños, lo que sugiere una susceptibilidad dependiente del sexo (Van Dijk et al, 2012).

También se ha reportado que altos niveles de glucosa, insulino-resistencia, alta presión arterial y dislipemia están asociados con altos niveles de cortisol (Reynolds et al, 2001; Wang et al, 2006; Ward et al, 2003). Además se ha demostrado que los efectos adversos de los GC sobre el perfil metabólico persisten en individuos con diabetes tipo 2 a pesar de ser tratados con drogas para prevenir la enfermedad cardiovascular (Reynolds et al, 2010). Más aún, los niveles elevados de cortisol en ayunas correlacionan no solo con factores de riesgo cardiovascular, sino también con dicha enfermedad (Reynolds et al, 2010).

### **Insulino-Resistencia**

La tolerancia anormal a la glucosa o intolerancia a la glucosa ocurre cuando los niveles de glucosa en sangre son más altos de lo normal pero no son tan elevados como para ser clasificados como diabetes. Las personas que sufren intolerancia a la glucosa tienen un elevado riesgo de desarrollar diabetes, al igual que un alto riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares e infecciones (Anonymous2013).

En la insulino-resistencia (figura 3) el músculo, tejido adiposo y el hígado no responden apropiadamente a la insulina, por lo que no pueden absorber glucosa del torrente sanguíneo. Como consecuencia, el cuerpo necesita niveles mayores de insulina para que la glucosa pueda entrar a las células. Las células  $\beta$  pancreáticas deben producir más insulina para compensar este incremento en la demanda. Mientras el páncreas sea capaz de producir suficiente cantidad de insulina para compensar esta insulino-resistencia los niveles de glucosa en circulación se mantendrán dentro de valores normales.

Con el tiempo la insulino-resistencia lleva al desarrollo de diabetes tipo 2 debido a que las células  $\beta$  pancreáticas comienzan a no poder abastecer eficientemente al organismo de la cantidad de insulina que necesita. Entonces, los niveles de glucosa circulante se elevan por encima de los valores normales, produciendo prediabetes y diabetes tipo 2 (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease 2017)



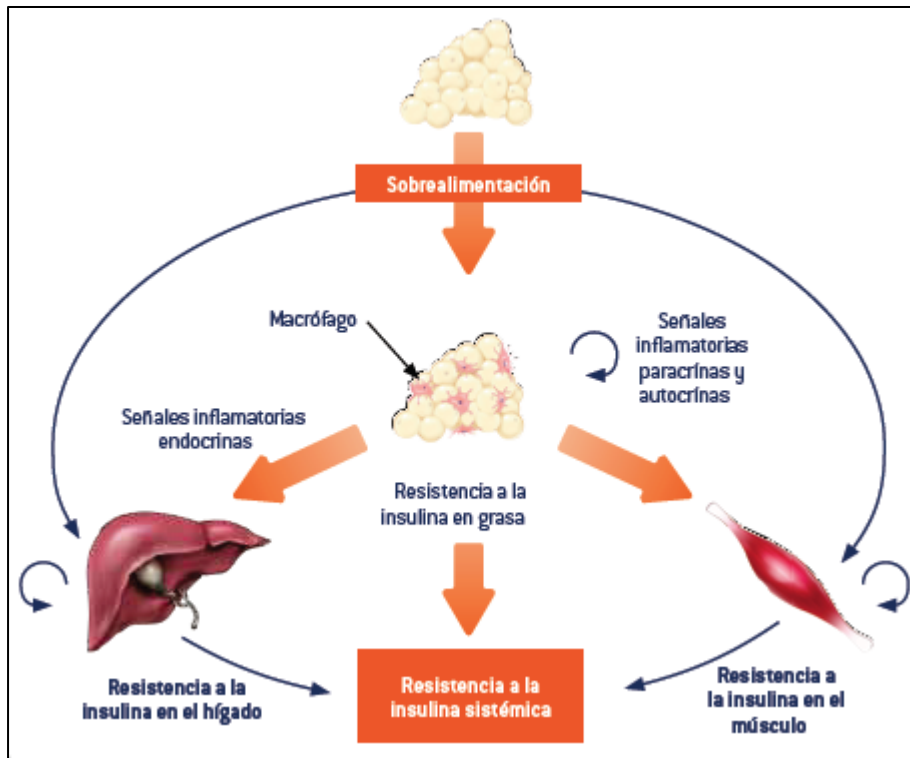


Figura 3: Desarrollo de insulino-resistencia: La hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo llevan a un aumento en la cantidad de macrófagos reclutados por este tejido, lo que genera un incremento en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Estas citoquinas interfieren en la correcta señalización de la insulina afectando órganos dependientes de insulina como el hígado y el músculo.

Es importante destacar que la prevalencia de la intolerancia a la glucosa en Sudamérica en el año 2013 era de 7,4% (aproximadamente 22.4 millones de personas). El gasto anual en salud (en el mismo año) ocasionado tanto por los distintos tipos de diabetes como por la intolerancia a la glucosa fue de 26.2 miles de millones de dólares, se estima que este gasto para el año 2035 rondará los 34.8 miles de millones de dólares (Anonymous2013).

### **El tejido adiposo, la inflamación y el desarrollo de insulino-resistencia**

En la actualidad se sabe que la obesidad está relacionada con la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, infiltración de células inmunes y el mal funcionamiento de los tejidos involucrados en la homeostasis de la glucosa. Alteraciones del metabolismo lipídico acompañan la obesidad y pueden impedir la correcta señalización de la insulina.



Existen dos tipos distintos de tejido adiposo: el tejido adiposo marrón (TAM) y el blanco (TAB). El tejido adiposo blanco posee un rol más importante en la obesidad y la insulino-resistencia. Su función tradicional es el depósito de lípidos, almacenamiento de triacilglicerol (TAG) luego de un exceso de energía, y la movilización de estos depósitos durante períodos de privación de nutrientes (Gregoire et al, 1998). El TAB es un órgano complejo, multicelular, compuesto principalmente por adipocitos, pre-adipocitos y poblaciones de células residentes inmunes (figura 4). Además actúa como un órgano endocrino liberando sustancias bioactivas denominadas adipoquinas, entre las que se encuentran interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), leptina y adiponectina.

Este tejido se adapta fácilmente tanto a la falta de nutrientes como a su exceso, debido a la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos. La expansión del TAB (que ocurre con la ganancia de peso corporal) está acompañada por cambios en la secreción de citoquinas y quimioquinas, infiltración de células inmunes, desregulación del metabolismo y depósito de los AGL (ácidos grasos libres) (Osborn and Olefsky 2012). Los adipocitos maduros secretan IL-6, la proteína quimioattractante de monocitos tipo 1 (MCP-1), leptina y adiponectina que pueden actuar en forma autócrina, parácrina y endocrina para regular la homeostasis de la glucosa y los lípidos (Curat et al, 2004). En ratones obesos, se ha encontrado que la expresión se encuentra aumentada. (Ishii-Yonemoto et al, 2010). Esto promueve la infiltración de monocitos, que luego se diferencian a macrófagos. Estos macrófagos secretan quimioquinas y citoquinas, exacerbando aún más el ambiente pro-inflamatorio (Osborn and Olefsky 2012).

La fracción del estroma vascular está compuesta por diversas células inflamatorias metabólicamente activas (Calder et al, 2011), por lo que posee un rol crítico en la expansión normal del tejido graso (Sun et al, 2011) (figura 5). Tanto la obesidad como la ingesta de una dieta rica en grasas producen un incremento en el número de células de la fracción del estroma vascular, lo que afecta adversamente el metabolismo (Strissel et al, 2010). El aumento del peso corporal está asociado con un incremento del número de pre-adipocitos y se ha sugerido que la expansión de esta población celular está asociada con la insulino-resistencia (McLaughlin et al, 2014). Este tipo celular secreta mayor cantidad de mediadores pro-inflamatorios que los adipocitos maduros (Mack et al, 2009; Poulain-Godefroy and Froguel 2007).

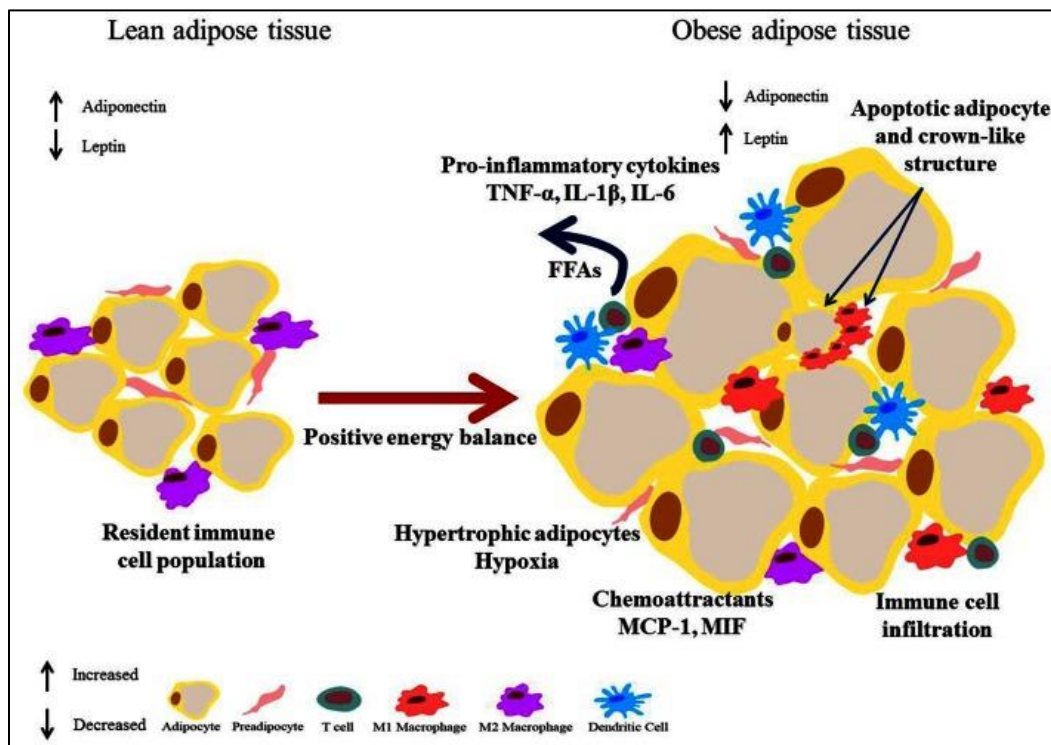


Figura 4. La expansión del tejido adiposo en la obesidad resulta en inflamación y desregulación metabólica. El exceso de energía produce la expansión e hipertrofia de los adipocitos, que secretan quimioattractantes, que atraen células del sistema inmune al tejido. La secreción de mediadores pro-inflamatorios genera la polarización de los macrófagos a un fenotipo M1 pro-inflamatorio. El aumento en la lipólisis produce la generación de niveles crecientes de ácidos grasos libres. Este ambiente impacta negativamente en la señalización de insulina lo que lleva a un estado de insulino-resistencia (McArdle et al, 2013).

Los macrófagos del tejido adiposo (MTAs) pueden ser clasificados en base a la expresión de sus marcadores de superficie y/o del perfil de expresión de quimioquinas y citoquinas. La cantidad y el fenotipo de los mismos se ven alterados en modelos de obesidad inducidos por dieta y genéticos. En la obesidad hay grandes proporciones de macrófagos tipo 1 (M1), clásicamente activados, pero menos de los de tipo 2 (M2) que son los capaces de resolver el estado inflamatorio (Fujisaka et al, 2009; Lumeng et al, 2007). Los tipo 1 secretan citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, mientras que los macrófagos tipo 2 secretan citoquinas anti-inflamatorias incluyendo IL-10 (Lumeng et al, 2007). El grado de infiltración por macrófagos está asociado con la progresión de la insulino-resistencia (Osborn and Olefsky 2012). El inmuno-fenotipo de los macrófagos es altamente plástico, en respuesta al medioambiente que lo rodea (Mosser and Edwards 2008). La infiltración de macrófagos tipo 1 disminuye la sensibilidad a la insulina como resultado de un aumento en la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. La infiltración de macrófagos en el tejido adiposo se puede detectar una semana después de comenzar la ingesta de una dieta grasa (Lynch et al, 2012) y se incrementa progresivamente con el tiempo en forma proporcional a la obesidad. La pérdida de peso está asociada con una disminución del número de macrófagos del tejido adiposo (Kosteli et al, 2010), pero una rápida pérdida de peso inicial también está acompañada por la infiltración transitoria de macrófagos (Sun et al, 2011).

Se ha observado que el aumento del peso corporal está acompañado por una disminución de las células T regulatorias (Treg) tanto en humanos como en roedores (Feuerer et al, 2009; Winer et al, 2009). Este tipo celular juega un rol crucial en el mantenimiento de la homeostasis inmune (Feuerer et al, 2009) debido a que secreta citoquinas anti-inflamatorias, promoviendo el fenotipo de M2 (Osborn and Olefsky 2012). La ingesta de una dieta rica en grasas incrementa el número de células T helper 1 (Th1, con función pro-inflamatoria) bloqueando las secreciones anti-inflamatorias de las células T regulatorias y de las T helper 2 (Th2) (Winer et al, 2009).

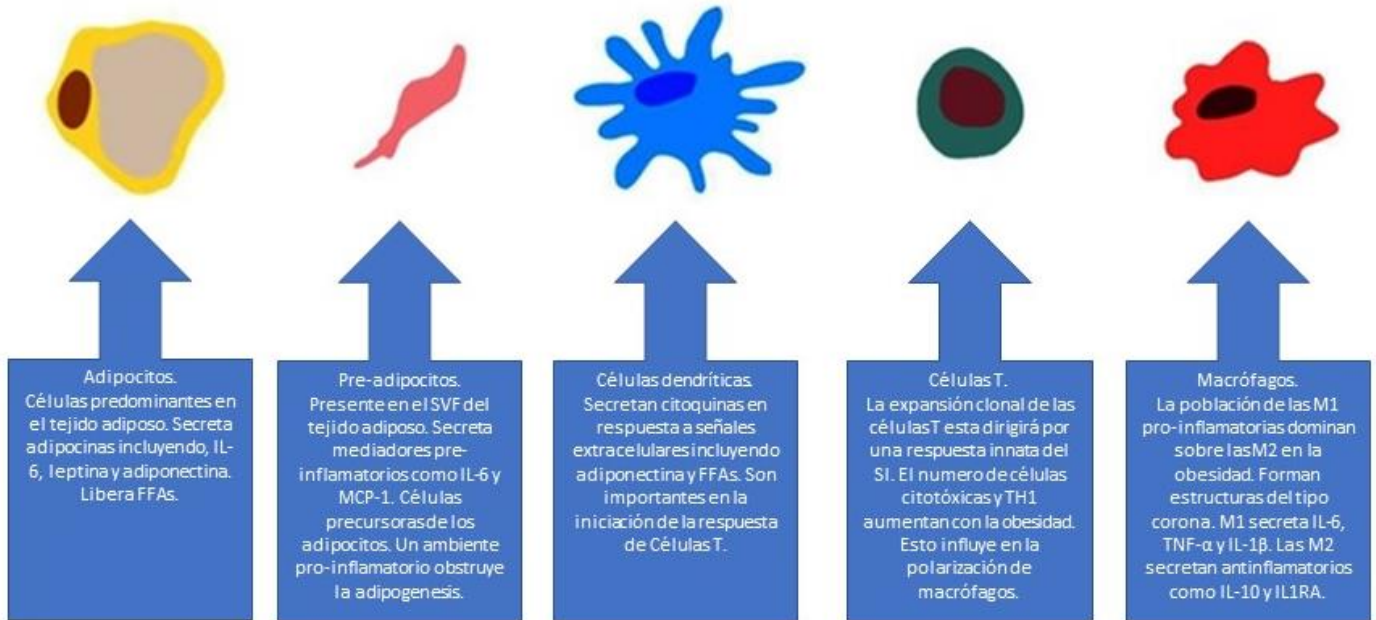


Figura 5: Grupos de células involucradas en la insulino-resistencia e inflamación inducida por obesidad (McArdle et al, 2013)

La desregulación metabólica ha sido atribuida a numerosas citoquinas pro-inflamatorias secretadas por las células inmunes en el tejido adiposo del individuo obeso. Los principales mediadores inflamatorios que se ha demostrado que están involucrados en la señalización de insulina (McArdle et al, 2013) son:

**a) Interleuquina 1 beta:** perturba la adipogénesis en modelos humanos y murinos (McArdle et al, 2013). El tejido adiposo visceral de un obeso expresa más IL-1 $\beta$  y receptor tipo 1 de IL-1 (IL-1R1) (Juge-Aubry et al, 2003), el aumento de IL-1 $\beta$  circulante está asociada con un mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (Spranger et al, 2003). Se ha observado que ratones que no poseen el antagonista de IL-1R1 (IL-1RA) están protegidos de la intolerancia a la glucosa inducida por la ingesta de una dieta rica en grasas (De et al, 2009). Además, el tratamiento con IL-1RA de ratones alimentados con una dieta rica en grasas mejora la intolerancia a la glucosa y los protege de la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas inducida por la obesidad (Sauter et al, 2008).

**b) Interleuquina 10:** es una citoquina anti-inflamatoria producida por los monocitos, los macrófagos tipo 2, las células dendríticas, las células T y las B. IL-10 juega un rol protector en

la desregulación metabólica y la insulino-resistencia inducida por obesidad. Los niveles de IL-10 están disminuidos en la diabetes tipo 2 (van et al, 2002) y la pérdida de peso aumenta su expresión en TAB lo que coincide con la disminución de la expresión de genes pro-inflamatorios (Canello et al, 2005). El pre-tratamiento de una línea de adipocitos con IL-10 bloquea los efectos nocivos de TNF- $\alpha$  y aumenta el transporte de glucosa estimulado por insulina (Lumeng et al, 2007).

**c) Interleuquina 6:** es secretada por el TAB, el músculo esquelético y el hígado (Fasshauer et al, 2003; Weisberg et al, 2003; Wieckowska et al, 2008). La expresión IL-6 en TAB y plasma está correlacionada con el índice de masa corporal (IMC) (Vozarova et al, 2001) y estimulada por insulina y TNF- $\alpha$ , tiene un impacto negativo en la señalización de insulina (Fasshauer et al, 2003; Ruge et al, 2009). Además, se ha demostrado recientemente que IL-6 estimula la secreción de insulina por medio del aumento de expresión del péptido similar a glucagon tipo 1 (GLP-1) en células pancreáticas. Esto sugiere que la secreción de IL-6 inducida por la obesidad podría ser la responsable de incrementar la producción de insulina en la insulino-resistencia del obeso. Mientras la elevada secreción de IL-6 en TAB e hígado es desfavorable, lo contrario sucede con el tejido muscular (Pedersen 2011).

## Hipótesis

Postulamos que los ratones de la cepa C57BL/6J mostrarán diferente susceptibilidad a desarrollar insulino-resistencia luego de haber sido sometidos a estrés gestacional y alimentados con distintas dietas (rica en grasa o dieta normal). Esta diferencia de susceptibilidades se verá reflejada en el nivel de expresión de genes relacionados con la vía inflamatoria, responsables del desarrollo de insulino-resistencia.

## **Metodología**

### **Animales y diseño experimental**

Utilizamos ratones hembras preñadas de la cepa C57BL/6J criadas en el bioterio del instituto de entre 12 y 16 semanas de edad. Las hembras gestantes, fueron alojadas en forma individual con libre acceso al agua y al alimento. A partir del día 15 de gestación, los animales fueron divididos en dos grupos:

- 1) estresados por inmovilización (n=9) (por 2 hs durante 7 días de 10 a 12 AM) o
- 2) no estresados (n=7).

Luego del nacimiento de las crías, entre los 5 y 7 días de vida de las mismas, las camadas fueron reducidas a 8 animales, los cuales fueron sexados. Al momento del destete (21 días de vida) las crías fueron divididas en 2 grupos que recibieron distintas dietas:

- A) dieta grasa de alto contenido calórico (60% kcal extra procedentes de lípidos) o
- B) dieta control.

Por lo tanto, los grupos experimentales para cada sexo fueron (ver figura 6):

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

Durante todo el experimento se registró el peso corporal de los animales en forma semanal. Todos los animales fueron alojados en grupos con la misma cantidad de animales (n=4) y tuvieron libre acceso al agua y el alimento. La temperatura ambiente se mantuvo estable entre 19-22°C y bajo un ciclo de luz:oscuridad de 12:12hs (luz de 7AM a 7PM).

El presente protocolo ha sido aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-UCA-CONICET, resolución N°007/2016).



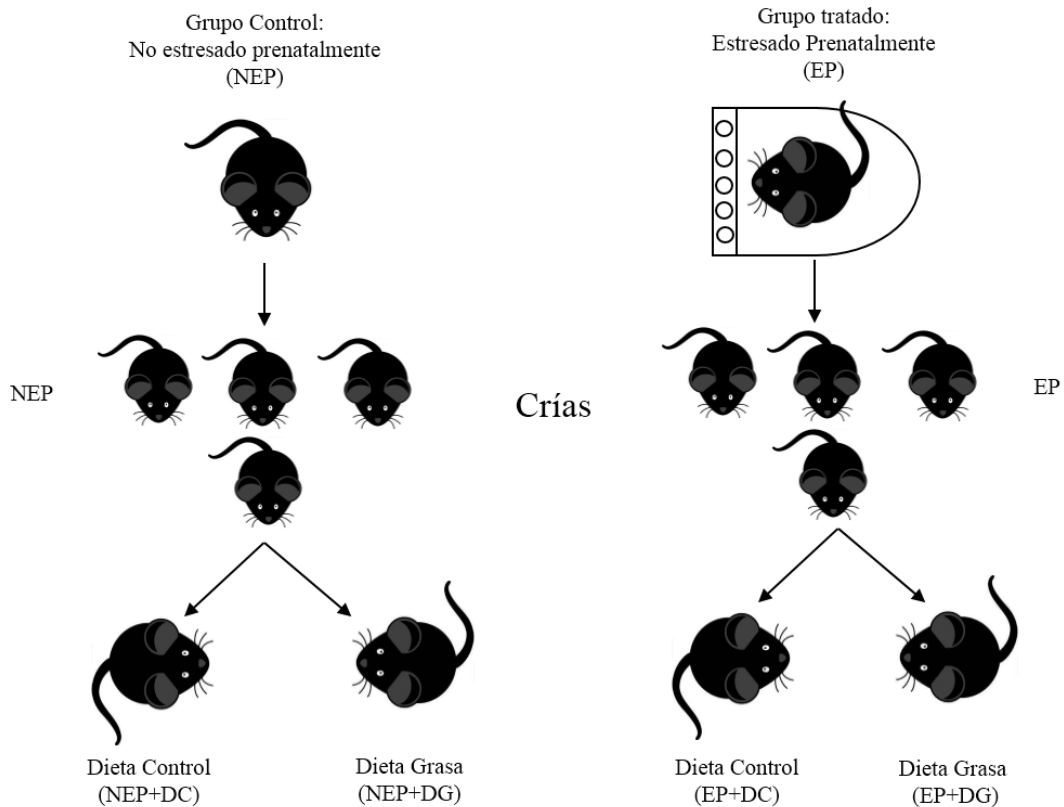


Figura 6: Diseño experimental utilizado. A la izquierda grupo control: no estresado prenatalmente (NEP), a la derecha grupo estresado prenatalmente (EP) por inmovilización. Las crías de ambos grupos al momento del destete fueron divididas en dos dietas: dieta control (DC) y dieta grasa (DG).

### Preparación de la dieta rica en grasas

Este alimento se preparó en el laboratorio. Está formado por el pellet de la dieta control al que se le agregó manteca y grasa porcina (derretidas) de modo que un 60% de las kilocalorías totales de la dieta provengan de los lípidos agregados. Este alimento es utilizado en el laboratorio en forma habitual sin inconvenientes.

### Estrés por inmovilización

Las hembras preñadas fueron sometidas a estrés por inmovilización durante la última semana de gestación (día 14 al 21). Para esto los animales fueron colocados dentro de un envase



de polipropileno de 4 cm de diámetro por 10 cm de largo (con ventilación adecuada, ver figura 7) durante 2 horas, todos los días al mismo horario.

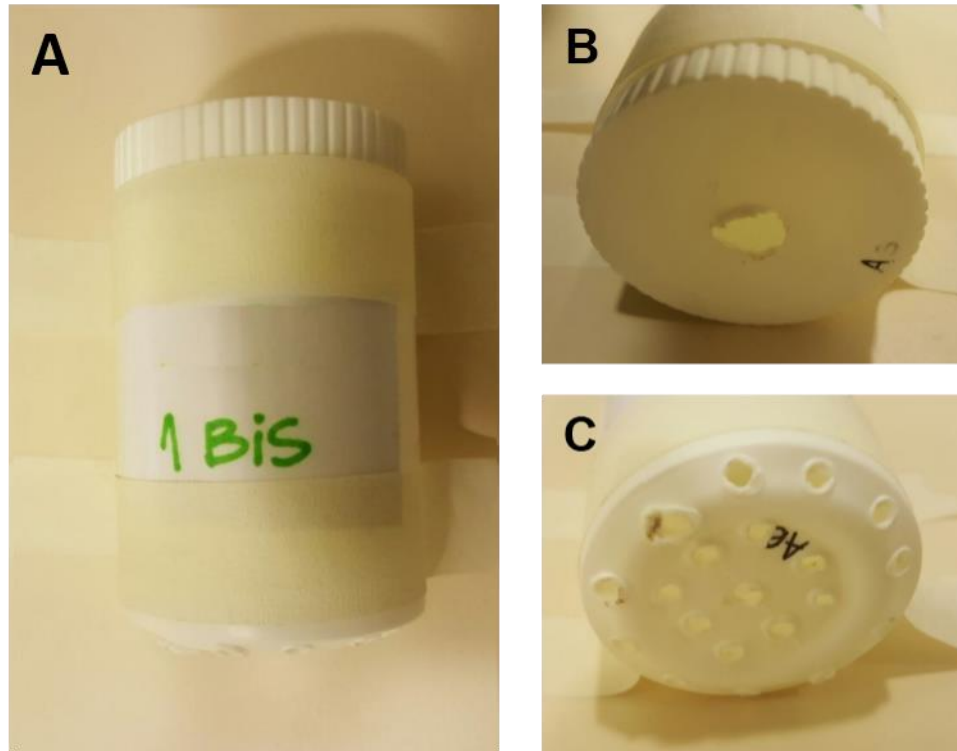


Figura 7: envase utilizado para estresar a las hembras preñadas. A: vista superior, vista superior; B: vista de la tapa que posee un orificio para insertar la cola del ratón; C: vista de la base del envase con numerosos orificios de respiración.

### **Curva de tolerancia a la glucosa.**

Se inyectó en forma intraperitoneal D-glucosa 2mg/kg (J.T.Baker, NJ, EEUU) resuspendida en buffer fosfato estéril, luego de un ayuno de 6hs (realizado durante el ciclo de luz de los animales, de modo de minimizar el estrés). Se midió la glucemia a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos post-inyección, utilizando un glucómetro personal (Accu-chek Performa, Roche) a partir de sangre procedente de la cola de los animales (figura 8). Se siguieron las recomendaciones de McGuinness (McGuinness et al, 2009).

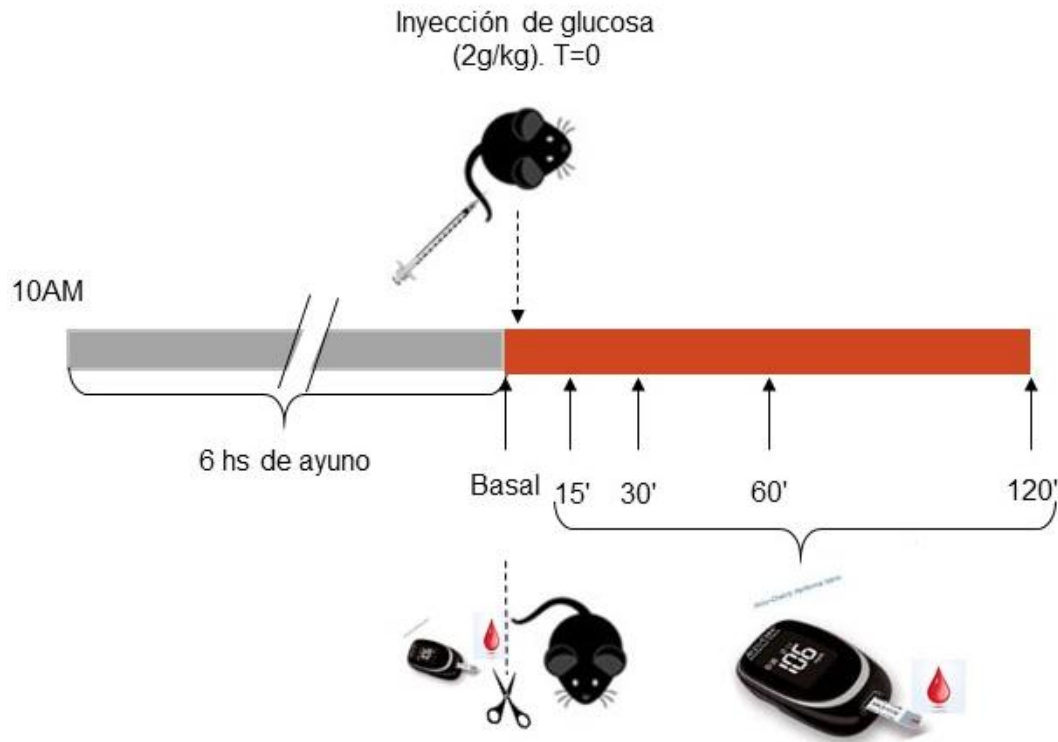


Figura 8: Esquema del protocolo de la curva de tolerancia a la glucosa. Luego de 6hs de ayuno durante el periodo de luz, se corta el extremo de la cola de los animales de modo de obtener una gota de sangre para la determinación de la glucemia basal utilizando un glucómetro personal, luego se inyecta en forma intraperitoneal 2g/kg de glucosa resuspendida en 0.1ml de buffer fosfato estéril ( $t=0$ ), se toman muestras de sangre de la cola a los 15, 30, 60 y 120 minutos post inyección. Hembras EP  $n=5$ , NEP  $n=6$ ; machos EP  $n=4$ , NEP  $n=5$ .

### Curva de tolerancia a la insulina

La curva de tolerancia a la insulina se realizó sobre animales no ayunados, a los que se les inyectó 1UI/kg de Insulina humana recombinante de corta duración (insuman-R, Sanofi-Aventis, Alemania). Se midió la glucemia a los 0, 15, 30 y 60 minutos post-inyección, utilizando un glucómetro personal (Accu-chek Performa, Roche) a partir de sangre procedente de la cola de los animales (figura 9). También en este caso se siguieron las recomendaciones de McGuinness (McGuinness et al, 2009).

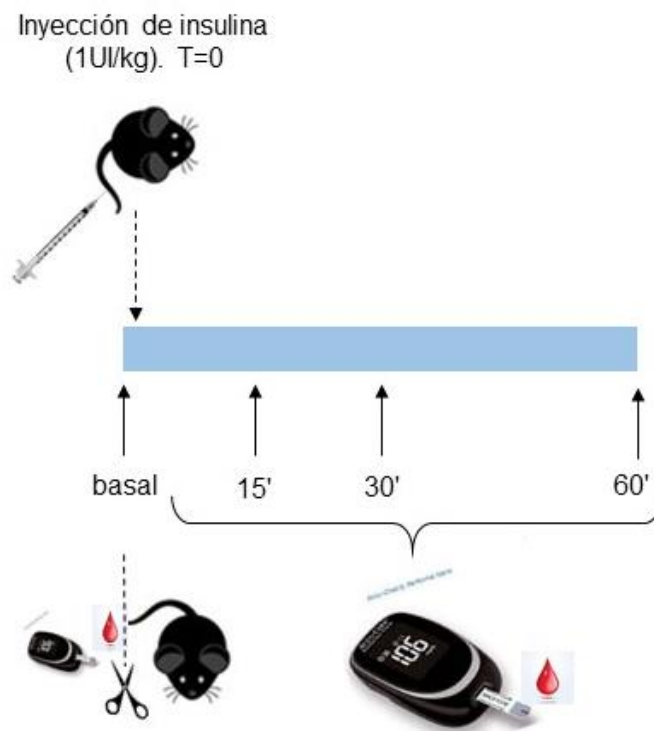


Figura 9: esquema de la curva de tolerancia a la insulina. Sin realizar ayuno previo, se corta el extremo de la cola de los animales de modo de obtener una gota de sangre para la determinación de la glucemia basal utilizando un glucómetro personal, luego se inyecta en forma intraperitoneal 1UI/kg de insulina diluida en buffer fosfato estéril, de modo de inyectar 0.1ml (t=0), se toman muestras de sangre de la cola a los 15, 30 y 60 minutos post inyección. Hembras EP n=5, NEP n=6; machos EP n=4, NEP n=5.

### Determinaciones plasmáticas

Sobre el plasma recolectado al momento del sacrificio se midió colesterol total (Colestat enzimático, Wiener lab, Rosario, Argentina) y triglicéridos (TG color GPO/PAP AA líquida, Wiener lab, Rosario, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Purificación del ARN del tejido adiposo abdominal

Se homogeneizó una porción del tejido adiposo abdominal en 1 ml de trizol utilizando un homogenizador de tejidos tipo Ultraturrax (IKA) y se colocaron los homogenatos en hielo. Para proceder a la purificación se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 5 min, se les agregaron 0.2ml cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), se agitaron vigorosamente los tubos, se colocaron en hielo y luego se dejaron 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 4°C por

15 min a 12000 x g en una centrifuga Eppendorf. Luego se transfirió la fase acuosa a tubos estériles y se agregaron 0.5ml de isopropanol (Biopack), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugaron 15 min a 4°C a 12000 x g. Posteriormente se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1ml de etanol 75% (Cicarelli). Luego se agitó en vortex y centrifugó a 7500 x g 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se dejó secar el pellet al aire por 10 min y se resuspendió en agua libre de nucleasas incubando 10 minutos a 55°C. El ARN se cuantificó mediante la medición de su absorbancia a 260nm y a 280nm, utilizando un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). La relación 260/280 indica el grado de pureza de las muestras respecto a las proteínas ya que los ácidos nucleicos absorben a 260nm y las proteínas a 280. Las muestras utilizadas presentaron una relación 260/280 entre 1.7 y 2.1, indicando que tenían una alta pureza.

### **Síntesis del ADN copia**

Se realizó la retrotranscripción del ARN para obtener el ácido desoxirribonucleico copia (). Para ello como primer paso se incubó 3.5ug de ARN junto con H<sub>2</sub>O, hexámeros de ADN de secuencia aleatorio y deoxinucleótidos (Invitrogen) y se incubaron por 5 min a 65° C. Se colocaron en hielo y se agregó Buffer First Strand, DTT, e inhibidor de RNasa (RNA sin, Genbiotech). Los tubos se colocaron en el termociclador (Applied Biosystem Veriti Thermal Cycler) por 2 min a 37°C. Luego se colocaron en hielo y se le agregó transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). Se incubó nuevamente en el termociclador, utilizando el siguiente programa: 10 min a 25°C, 50 min a 37°C y 15 min a 70°C. El ADNc obtenido se guardó a -20°C hasta ser usado.

### **Evaluación de la expresión génica en tejido adiposo abdominal de citoquinas por Real Time PCR**

Las reacciones de PCR en Tiempo Real se llevaron a cabo en un termociclador ABI7500 (Applied Biosystems) usando la mix comercial de Roche (FastStart Universal SYBR Green Master), que contiene Sybr Green como fluoróforo y ROX como referencia pasiva. Cada reacción fue realizada por duplicado, en un volumen final de 20µl,

utilizando como templado 4µl de ADNc diluido (dilución 1:10 de la reacción de transcripción reversa).

El protocolo utilizado para la reacción de PCR Real Time fue el recomendado por el proveedor de la mix utilizada (Roche): 1 ciclo de 95°C 5 min (activación de la Taq); 40 ciclos: 95°C 15seg, Ta primer (ver tabla 1) 20 seg y 72°C 30 seg (ver figura 10). Luego de esto se realizó una curva de melting que consiste en 1 ciclo de 95°C 15 seg, 60°C 1 min y un aumento gradual de la temperatura hasta los 95°C 30 seg, finalizando con las muestras a 60° por 15 seg (ver figuras 11 y 12).

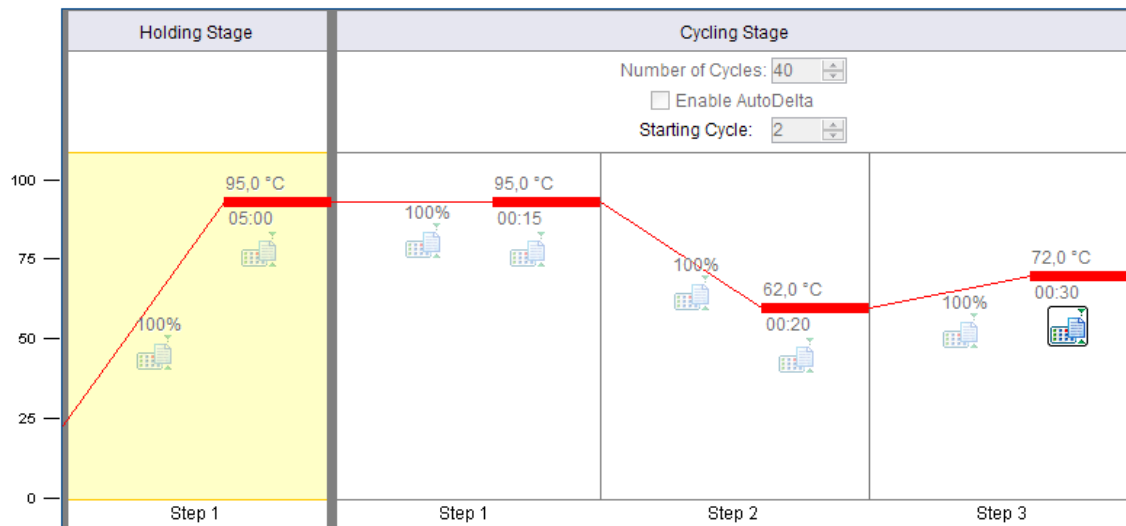


Figura 10: Protocolo utilizado en la reacción de PCR real time. Se utilizó de acuerdo a las instrucciones de la mix utilizada un protocolo con un ciclo de 5 minutos a 95°C para la activación de la TAQ, seguido de 40 ciclos compuestos por 15 segundos a 95°C, 20 segundos a la temperatura de annealing de los primers y 30 segundos a 72°C, en este paso es en donde se detectaba la fluorescencia en cada ciclo.

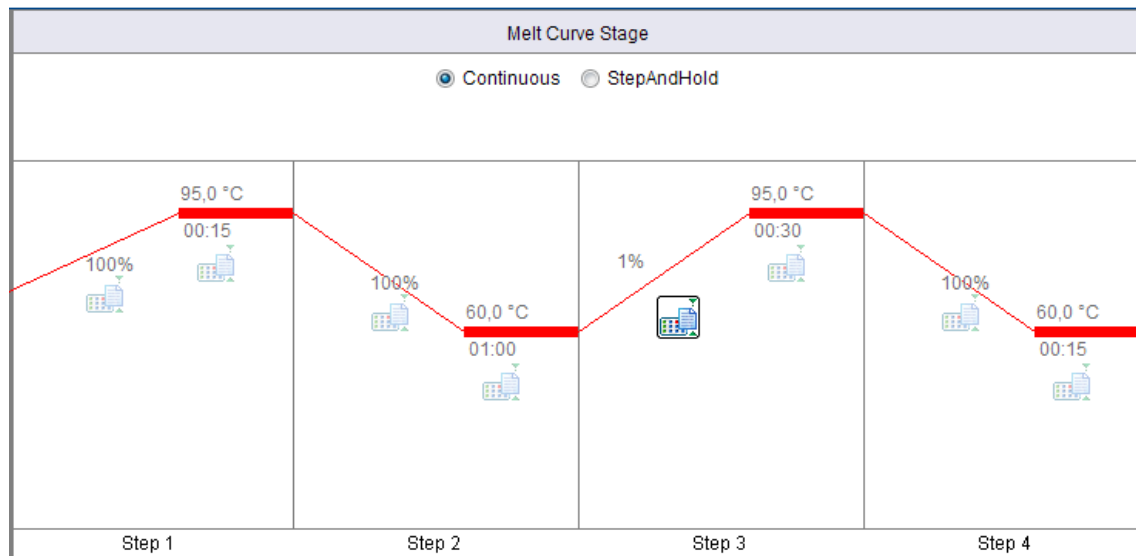


Figura 11: Protocolo de la curva de melting. Luego de completado el protocolo de extensión las muestras se llevan a 95°C, luego a 60°C y a partir de allí se comienza a subir progresivamente la temperatura en este paso se detecta la fluorescencia. La fluorescencia emitida por el Sybr Green se detecta cuando la hebra que lo contiene se encuentra en doble cadena, de modo que al aumentar la temperatura y con ello la cantidad de producto en simple cadena se observa una disminución de la fluorescencia, que luego se grafica como la derivada de la curva de fluorescencia.

Las secuencias de los primers fueron diseñadas usando el software Primer Express 1.5 (PE Biosystems) o el IDT Primer Quest, que incorpora el software Primer3 (versión 2.2.3) (Integrated DNA Technologies, Inc). Los primers fueron diseñados de modo que se encontraran localizados en uniones exón-exón o que el producto a amplificar contuviera un intrón para evitar así que los mismos amplifiquen ADN genómico. Los amplicones generados por dichos primers tuvieron entre 87-165 pb de longitud. Los oligonucleótidos utilizados en estos ensayos fueron comprados a IDT o Biodynamics. En la tabla 1, se observan las secuencias de cada uno de los primers diseñados como también la temperatura de “annealing”, longitud del producto y temperatura de melting específicas para cada uno de los genes de interés.

Gen objetivo	N° acceso		Secuencia 3'-5'	T° annealing	Longitud del producto	T° melting
IL-1 $\beta$	NM_008361.4	upper	GCCACCTTTTGACAGTGATG	62°C	165pb	84.7°C
		lower	AGTGATACTGCCTGCCTGAA			
IL-6	NM_001314054.1	upper	GGAAATGAGAAAAGAGTTGTG	58°C	109pb	73.9°C
		lower	GCATCCATCATTCTTTGTAT			
IL-10	NM_010548.2	upper	TGAATTCCTGGGTGAGAAGCTGA	58°C	147pb	79.1°C
		lower	TGGCCTTG TAGACACCTTGGTCTT			
$\beta$ -actina	NM_007393.5	upper	CAACTTGATGTATGAAGGCTTTGGT	58-62°C	97pb	79.8°C
		lower	ACTTTTATTGGTCTCAAGTCAGGTACAG			
G6PDH	NM_019468.2	upper	GAAGCTGCCAATGGATACTTAGA	58-62°C	99pb	75.6°C
		lower	CCACCGTTCATTCTCCACATAG			
PPIB	NM_011149.2	upper	CGAGTCGTCTTTGGACTCTTT	58-62°C	87pb	74.6°C
		lower	GCCAAATCCTTTCTCTCCTGTA			

Tabla 1: Contiene la secuencia de cada uno de los genes objetivos como también el número de acceso a estos, temperatura de “annealing”, longitud del producto y temperatura de “melting” específica.

Los resultados de expresión génica en el tejido adiposo se analizaron mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen 2001). Para ello fue necesario contar con un gen de referencia para relativizar los datos. Para la elección del gen de referencia se probaron diferentes genes en las muestras utilizadas (beta actina, glucosa 6 fosfato dehidrogenasa y peptidil-propil isomerasa b) y se evaluó cuál presentaba menor variabilidad entre los distintos tratamientos utilizando el software GeNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). En este caso fue peptidil-propil isomerasa b (ciclofilina b, PPIB). Dado que este método asume que la eficiencia de la reacción de PCR para cada gen es 2 (esto es que la cantidad de ADN blanco se duplica de ciclo en ciclo), otro miembro del laboratorio realizó en paralelo curvas de diluciones seriadas 1:10 de las muestras con cada par de primers para evaluar la eficiencia de la reacción para las condiciones determinadas.

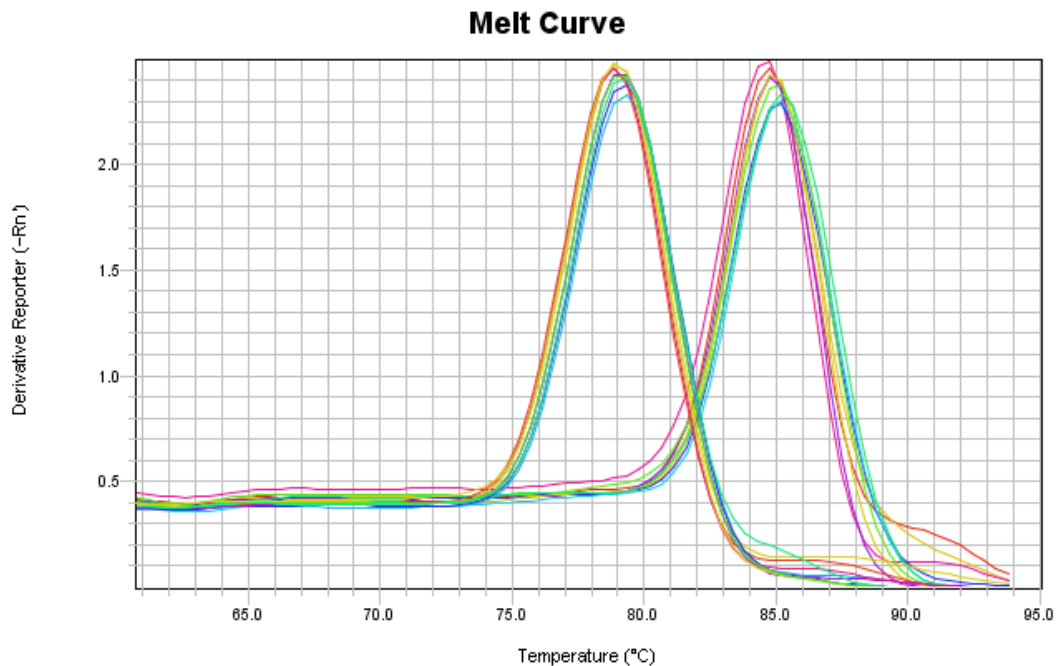


Figura 12: Se observa el grafico de la curva de melting, se grafica la derivada de la fluorescencia emitida por los productos obtenidos al disociarse por el aumento de la temperatura. Cada pico representa un producto específico, en este caso a la izquierda PPIB a la derecha IL-1 $\beta$ .

### Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  desvío estándar. Se controló que las variables fueran normales y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. Para variables continuas que presentaron distribución normal, las diferencias estadísticas entre las medias fueron evaluadas mediante un ANOVA de uno o varios factores con o sin medidas repetidas según corresponda. En el caso de las variables que no posean distribución normal, las mismas fueron transformadas mediante la aplicación de logaritmo. Utilizamos el programa CSS/Statistica V6.0 (Tulsa, USA) para realizar los análisis mencionados.



## Resultados

### Peso al destete

En primer lugar, registramos el peso de los animales al destete. En la figura 13 se observa el peso al destete de los ratones separados según su sexo y tratamiento prenatal recibido. No observamos diferencias en el peso al destete debidas al estrés prenatal ni al sexo.

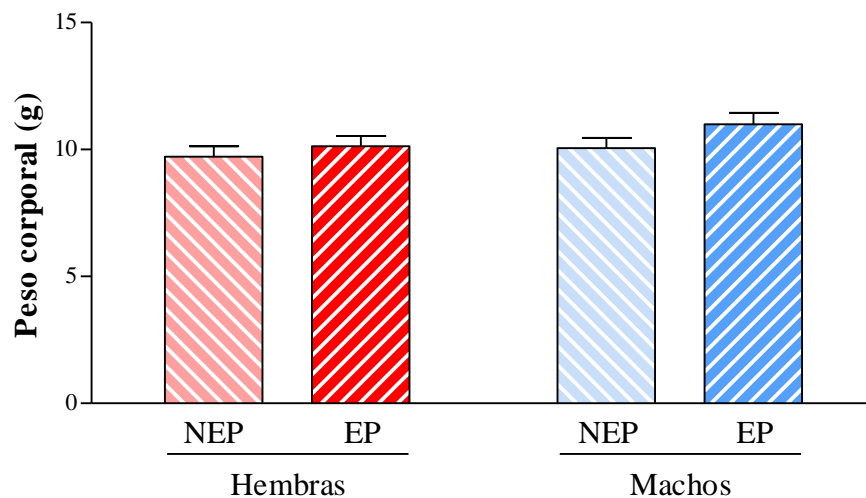


Figura 13: Peso corporal al destete (21 días de vida , hembras n=12 animales por grupo, machos n=10 por grupo).

### Efecto de la dieta y el estrés sobre el peso corporal

A las 4 semanas de vida los animales se separaron en dos tipos de dieta, dieta control (la dieta standard de roedores, DC) y una dieta rica en grasas (DG). La dieta rica en grasas fue utilizada para estudiar si hay algún efecto metabólico producido por el estrés que solo se hace visible ante un desafío como lo es la ingesta de este tipo de dieta. En la figura 14 puede observarse la curva de crecimiento de los animales desde la semana 6 hasta la semana 28 de vida. Las hembras estresadas prenatalmente y alimentadas con dieta grasa (EP+DG) a partir de la semana 19 muestran diferencias significativas respecto de las estresadas prenatalmente pero alimentadas con la dieta control ( $p < 0.01$  EP+DG vs EP+DC, n=5 en ambos grupos). Los machos estresados prenatalmente alimentados con dieta grasa (EP+DG) presentan diferencias en sus pesos a partir de la semana 12 (respecto de los estresados prenatalmente alimentados con dieta control,  $p < 0.001$  EP+DG vs EP+DC, n=4 en ambos grupos). Los machos no estresados

prenatalmente que consumieron la dieta rica en grasas (NEP+DG) presentaron un mayor peso corporal que los alimentados con la dieta control (NEP+DC) a partir de las 22 semanas de vida ( $p < 0.001$  NEP+DG vs NEP+DC,  $n = 5$  en ambos grupos).

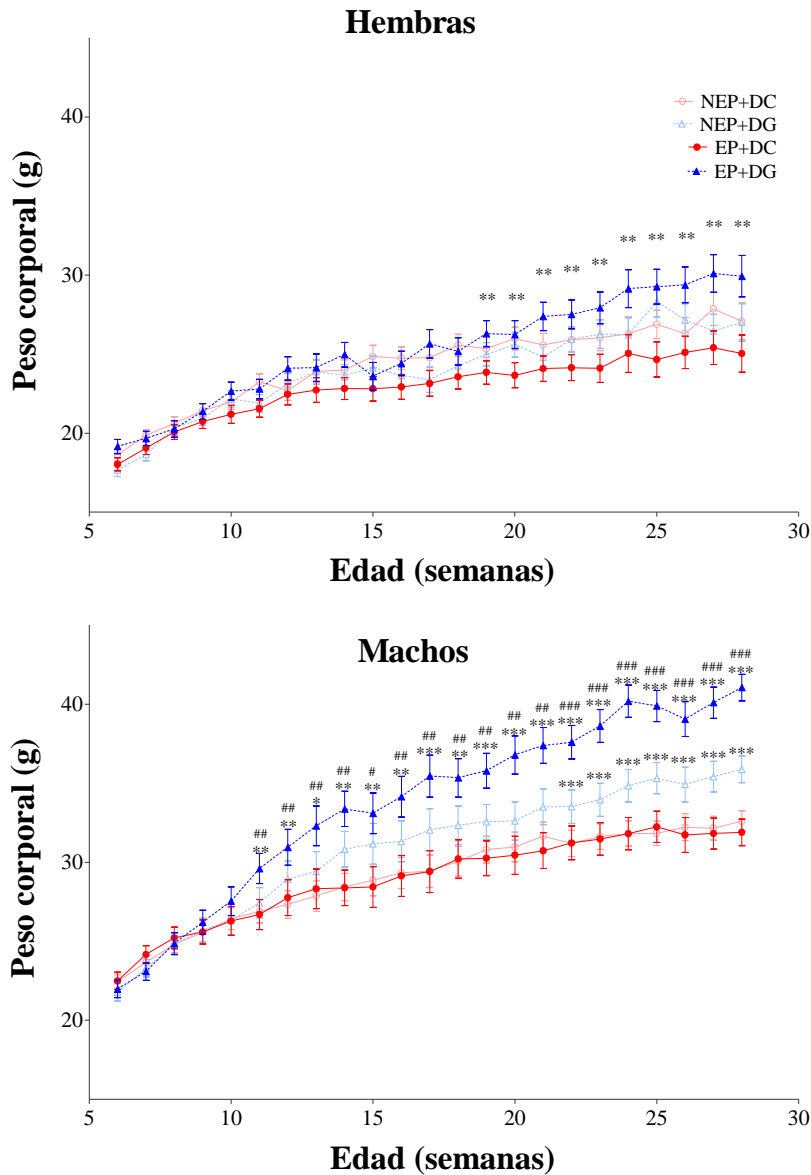


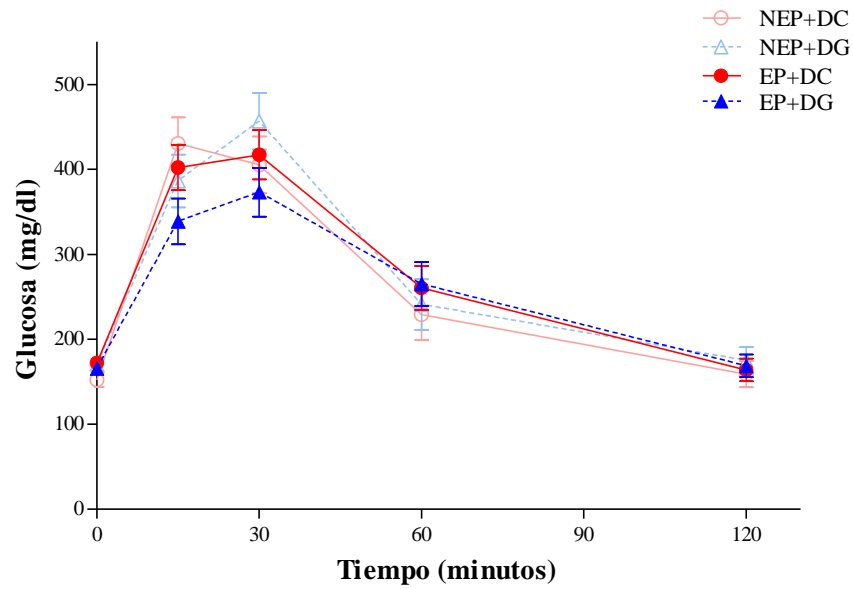
Figura 14: Curva de crecimiento de los animales desde las 6 hasta las 28 semanas de vida. Arriba hembras, abajo machos. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  mismo tratamiento prenatal dieta control (DC) vs dieta grasa (DG). # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  y ### $p < 0.001$  misma dieta estresados prenatalmente (EP) vs no estresados prenatalmente (NEP). Hembras EP  $n = 5$  por grupo, NEP  $n = 6$  por grupo, machos NEP ambos grupos  $n = 5$ , EP ambos grupos  $n = 4$ .

### **Tolerancia a la glucosa**

En la figura 15 se observa la glucemia de los animales en función del tiempo post inyección de glucosa intraperitoneal. Solo los machos alimentados con dieta grasa presentaron alteraciones en la respuesta a la glucosa. A los 60 y 120 minutos posteriores a la inyección de glucosa, los dos grupos de animales alimentados con dieta grasa (NEP+DG y EP+DG), independientemente de si sufrieron o no estrés prenatal presentaron una glucemia superior a sus controles (NEP+DC y EP+DC) ( $p < 0.001$  60 y 120 min NEP+DG vs NEP+DC y EP+DG vs EP+DC).

En la figura 16 se observa el área bajo la curva correspondiente al mismo test, donde se puede observar con más claridad las diferencias mencionadas: los machos alimentados con dieta grasa presentan una mayor área bajo la curva ( $p < 0.001$  NEP+DC vs NEP+DG y  $p < 0.001$  EP+DC vs EP+DG) y además los machos de estresados prenatalmente alimentados con dieta grasa tienen una mayor área bajo la curva que los no estresados alimentados con la misma dieta ( $p < 0.05$  EP+DG vs NEP+DG).

### Hembras



### Machos

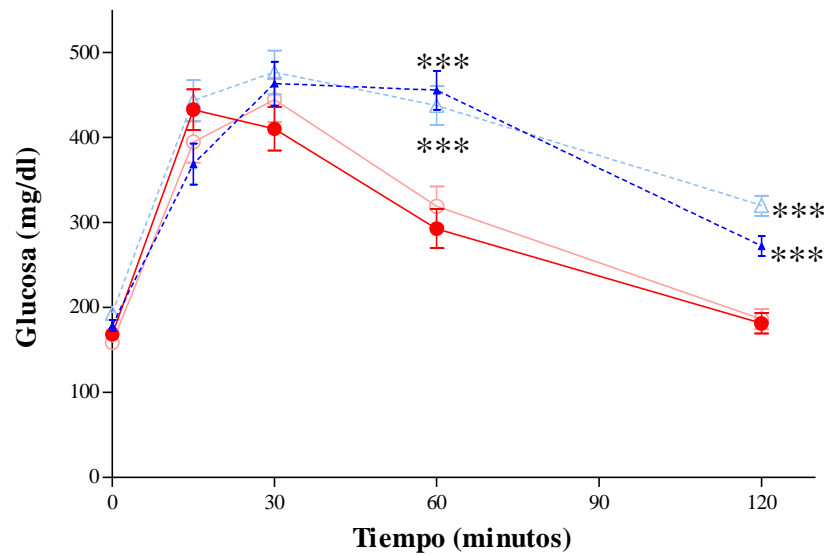


Figura 15: Curva de tolerancia a la glucosa realizada a las 24 semanas de vida. Se ayunaron los animales durante 6 horas en el periodo de luz, luego se inyectó una dosis de 2g/kg de D-glucosa disuelta en buffer fosfato estéril. Arriba hembras, abajo machos. \*\*\* $p < 0.001$  mismo

tratamiento prenatal dieta control (DC) vs dieta grasa (DG). Hembras EP n=5, NEP n=6; machos EP n=4, NEP n=5.

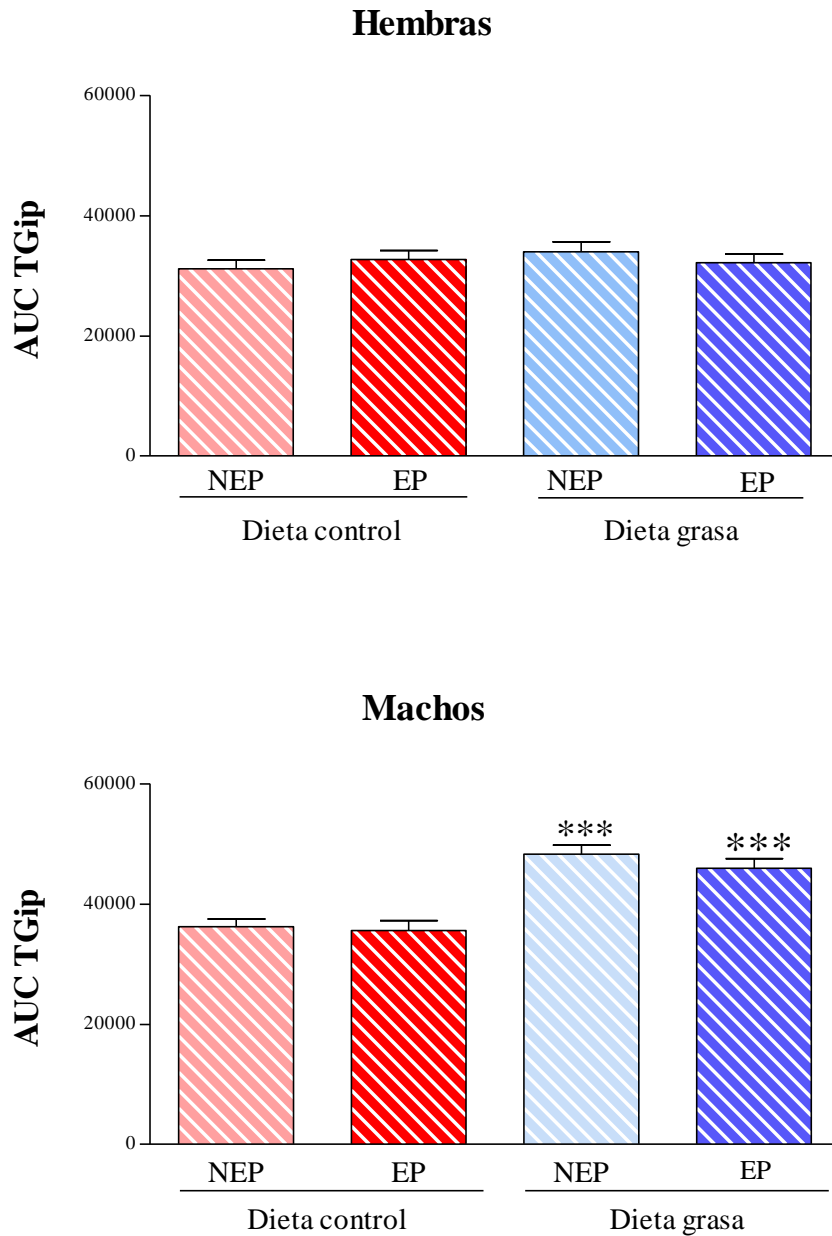


Figura 16: Área bajo la curva de tolerancia a la glucosa. Arriba hembras, abajo machos. \*\*\*p<0.001 mismo tratamiento prenatal dieta control (DC) vs dieta grasa (DG). #p<0.05 misma dieta estresados prenatalmente (EP) vs no estresados prenatalmente (NEP). Hembras EP n=5, NEP n=6; machos EP n=4, NEP n=5.

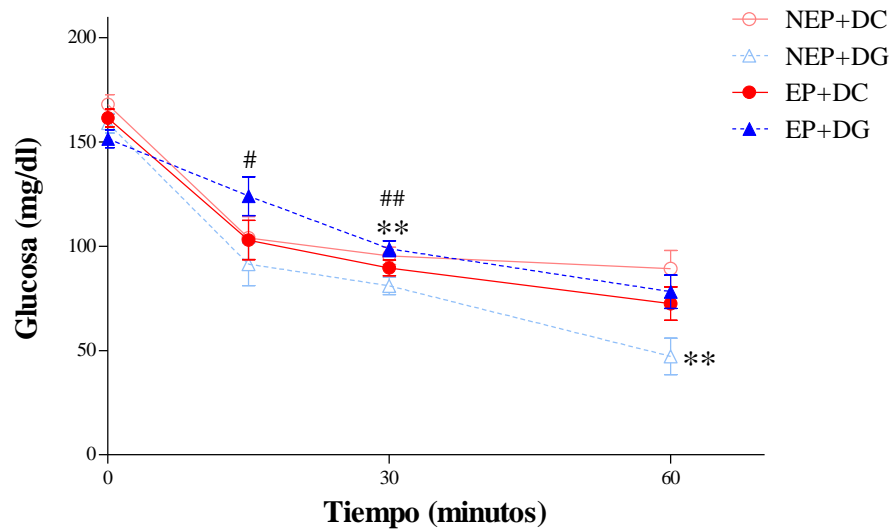
### **Tolerancia a la insulina**

Las hembras estresadas prenatalmente y alimentadas con la dieta rica en grasas (EP+DG) presentaron una respuesta anómala a la administración de insulina, con valores de glucemia a los 15 y 30 minutos posteriores a la inyección superiores a los del grupo control (figura 17: 15 minutos:  $p < 0.05$  EP+DG vs NEP+DG, 30 minutos:  $p < 0.01$  EP+DG vs EP+DC y vs NEP+DG). A los 60 minutos las hembras no estresadas prenatalmente pero alimentadas con dieta grasa (NEP+DG) presentaron una glucemia significativamente menor que las alimentadas con la dieta control (60 minutos:  $p < 0.01$  NEP+DG vs NEP+DC).

Los machos estresados prenatalmente y alimentados con dieta grasa (EP+DG) presentaron valores de glucemia luego de 15 minutos de la inyección de insulina significativamente mayores que los alimentados con dieta control (15 minutos:  $p < 0.05$  EP+DG vs EP+DC). A los 30 y 60 minutos post-inyección los estresados prenatalmente (EP), independientemente de la dieta recibida, presentaron valores de glucemia mayores que los no estresados prenatalmente (30 minutos:  $p < 0.001$  EP+DC vs NEP+DC y EP+DG vs NEP+DG, 60 minutos:  $p < 0.001$  EP+DC vs NEP+DC y EP+DG vs NEP+DG).

El área bajo de la curva (figura 18) es mayor en las hembras estresadas prenatalmente alimentadas con dieta grasa respecto a las no estresadas alimentadas con la misma dieta ( $p < 0.01$  EP+DG vs NEP+DG). Los machos estresados prenatalmente presentaron mayor área bajo la curva que los no estresados prenatalmente, independientemente de la dieta recibida ( $p < 0.01$  EP+DG vs NEP+DG y EP+DC vs NEP+DC).

### Hembras



### Machos

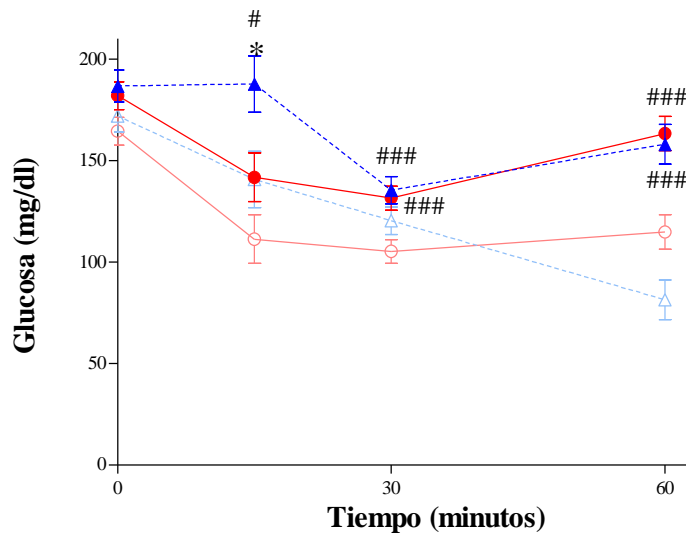


Figura 17: Curva de tolerancia a la insulina a las 25 semanas de vida. A los animales sin ayunar se les inyectó 1UI/kg de Insulina humana de corta duración disuelta en buffer fosfato estéril. Arriba hembras, abajo machos. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  mismo tratamiento prenatal dieta control (DC) vs dieta grasa (DG). # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  y ### $p < 0.001$  misma dieta estresados prenatalmente (EP) vs no estresados prenatalmente (NEP). Hembras EP  $n=5$ , NEP  $n=6$ ; machos EP  $n=4$ , NEP  $n=5$ .

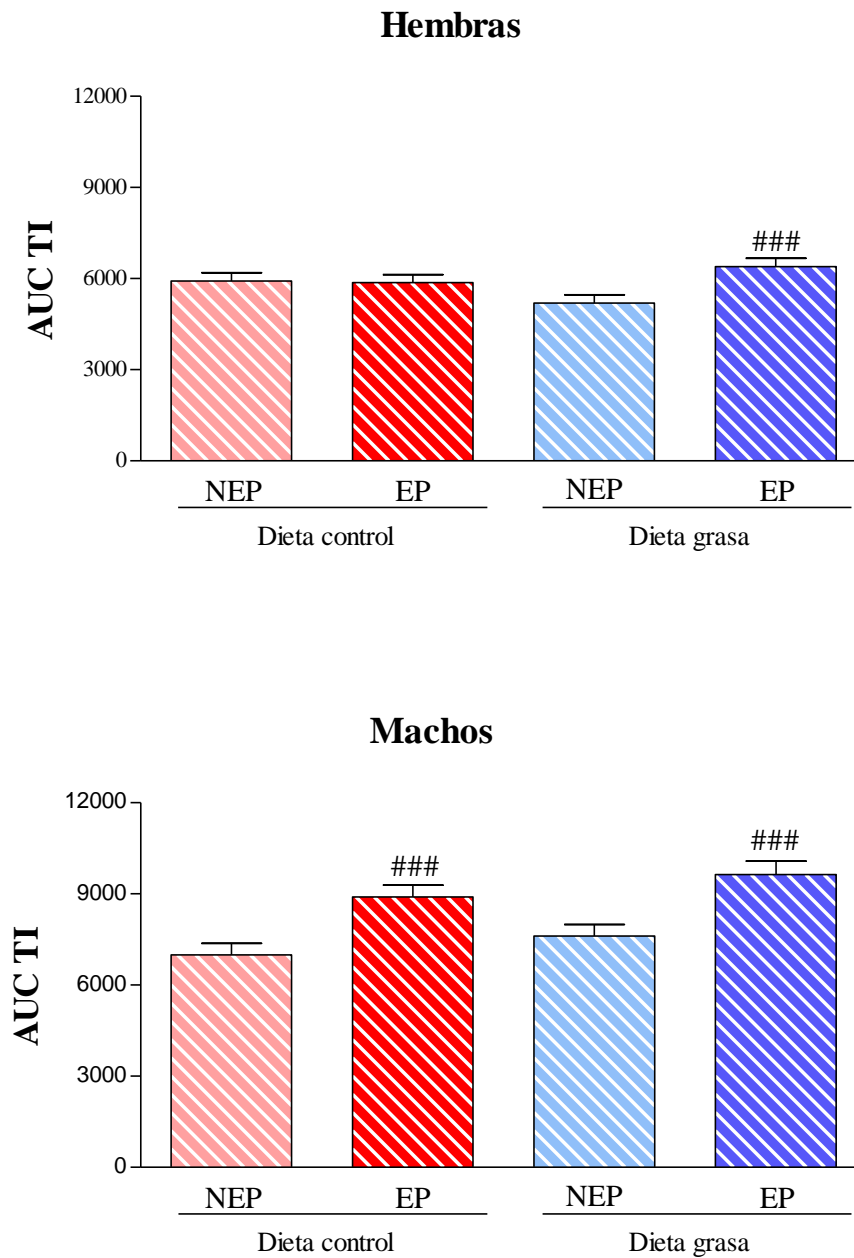


Figura 18: Área bajo la curva de tolerancia a la insulina. Arriba hembras, abajo machos. \*\* $p < 0.01$  mismo tratamiento prenatal dieta control (DC) vs dieta grasa (DG). \*\*\* $p < 0.001$  misma dieta estresados prenatalmente (EP) vs no estresados prenatalmente (NEP). Hembras EP  $n=5$ , NEP  $n=6$ ; machos EP  $n=4$ , NEP  $n=5$ .



### Colesterol total

En la figura 19, las hembras estresadas prenatalmente alimentadas con dieta grasa tuvieron mayores valores de colesterol total que los alimentados con dieta control ( $p < 0.01$  EP+DG vs EP+DC). En los machos los alimentados con dieta grasa presentaron mayores niveles de colesterol total respecto a los alimentados con dieta control ( $p < 0.001$  NEP+DG vs NEP+DC y EP+DG vs EP+DC).

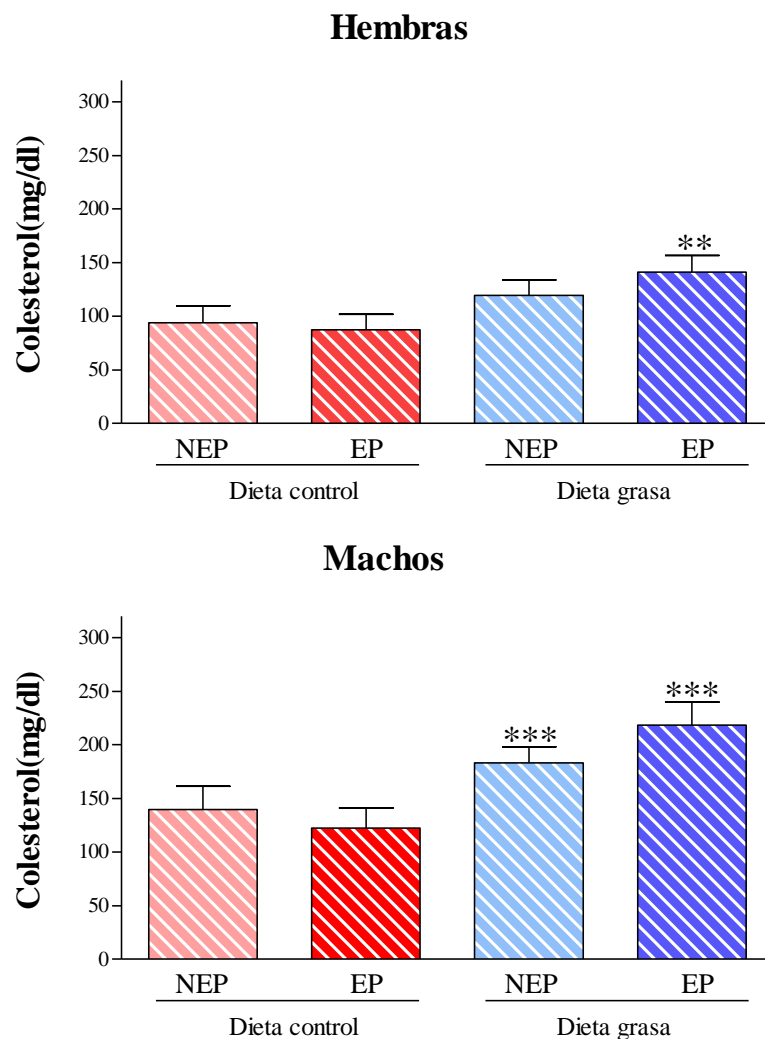


Figura 19: Colesterol plasmático total medido sobre el plasma obtenido al momento del sacrificio (28 semanas de vida). Arriba hembras, abajo machos. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  mismo tratamiento prenatal dieta control (DC) vs dieta grasa (DG). # $p < 0.05$  y ### $p < 0.001$  misma dieta estresados prenatalmente (EP) vs no estresados prenatalmente (NEP). Hembras EP  $n = 5$ , NEP  $n = 6$ ; machos EP  $n = 4$ , NEP  $n = 5$ .

## Triglicéridos

En la figura 20, los machos estresados prenatalmente y alimentados con dieta grasa tuvieron mayor nivel de triglicéridos plasmáticos al compararlos con los alimentados con dieta control ( $p < 0.001$  EP+DG vs EP+DC) y con los no estresados prenatalmente alimentados con dieta grasa ( $p < 0.001$  EP+DG vs NEP+DG).

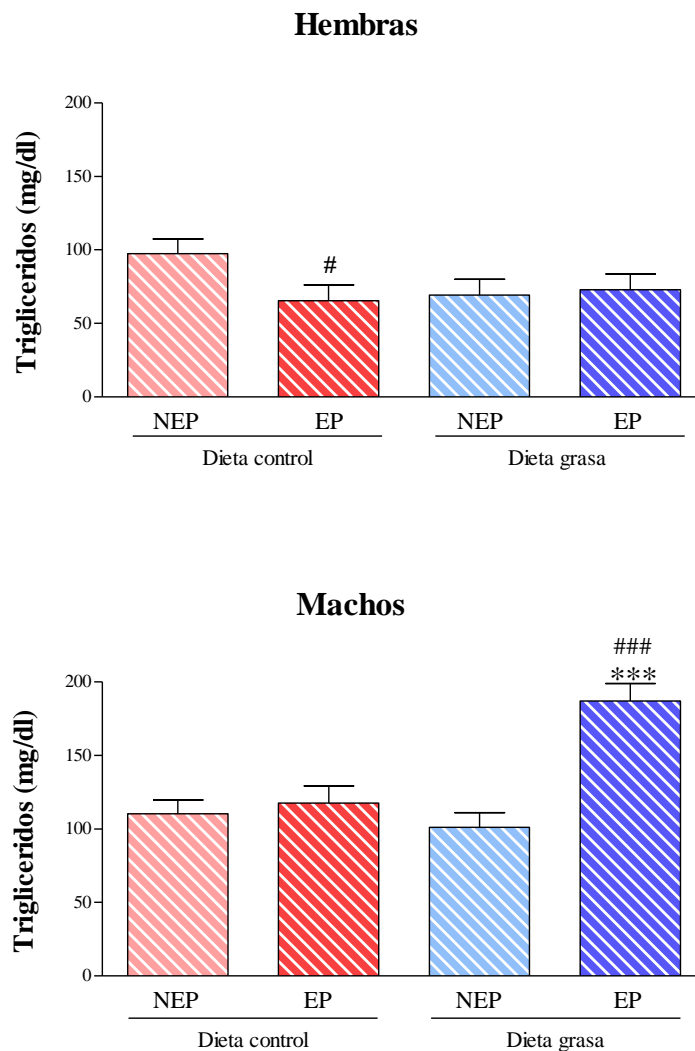


Figura 20: Triglicéridos plasmáticos. Arriba hembras, abajo machos. \*\*\* $p < 0.001$  mismo tratamiento prenatal dieta control (DC) vs dieta grasa (DG). # $p < 0.05$  y ### $p < 0.001$  misma dieta estresados prenatalmente (EP) vs no estresados prenatalmente (NEP). Hembras EP  $n=5$ , NEP  $n=6$ ; machos EP  $n=4$ , NEP  $n=5$ .

### **Evaluación de la expresión de ARNm de citoquinas en tejido adiposo**

La expresión génica se midió únicamente en el tejido adiposo abdominal de los ratones machos debido a que fueron los que presentaron mayor cantidad de parámetros alterados ante el tratamiento prenatal. Estos resultados pueden observarse en la figura 21.

Al ser alimentados con una dieta grasa, los animales EP presentaron valores de IL-6 significativamente mayores a los NEP bajo la misma dieta ( $p < 0.001$  EP+DG vs NEP+DG,  $n=4$  en todos los grupos) y que los del mismo tratamiento prenatal pero alimentados con la dieta normal ( $p < 0.001$  EP+DG vs EP+DC). Además los no estresados prenatalmente alimentados con dieta grasa mostraron mayor expresión de IL-6 en el tejido adiposo que los NEP alimentados con dieta control ( $p < 0.05$  NEP+DG vs NEP+DC).

No obtuvimos diferencias significativas en la expresión de ARNm de IL-1 $\beta$  con los tratamientos utilizados (NEP  $n=4$  ambas dietas, EP  $n=3$  ambas dietas).

Sobre la expresión en tejido adiposo de IL-10 pudimos observar que la ingesta de una dieta rica en grasas produjo un aumento en la expresión, independientemente del tratamiento prenatal ( $p < 0.001$  NEP+DG vs NEP+DC,  $n=4$  ambos grupos;  $p < 0.01$  EP+DG vs EP+DC,  $n=3$  en ambos grupos). Además, los EP alimentados con dieta grasa expresaron menos IL-10 que los NEP bajo la misma dieta ( $p < 0.01$  EP+DG vs NEP+DG).

Con el fin de observar el balance pro-inflamatorio/anti-inflamatorio graficamos la relación entre estas citoquinas que mostraron diferencias en su expresión debidas a los tratamientos. La relación IL-6/IL-10 fue significativamente mayor para los animales EP alimentados con dieta grasa con respecto a los NEP alimentados con la misma dieta ( $p < 0.05$  EP+DG vs NEP+DG). Esto indicaría que el balance estaría inclinado para la pro-inflamación en los animales EP+DG.

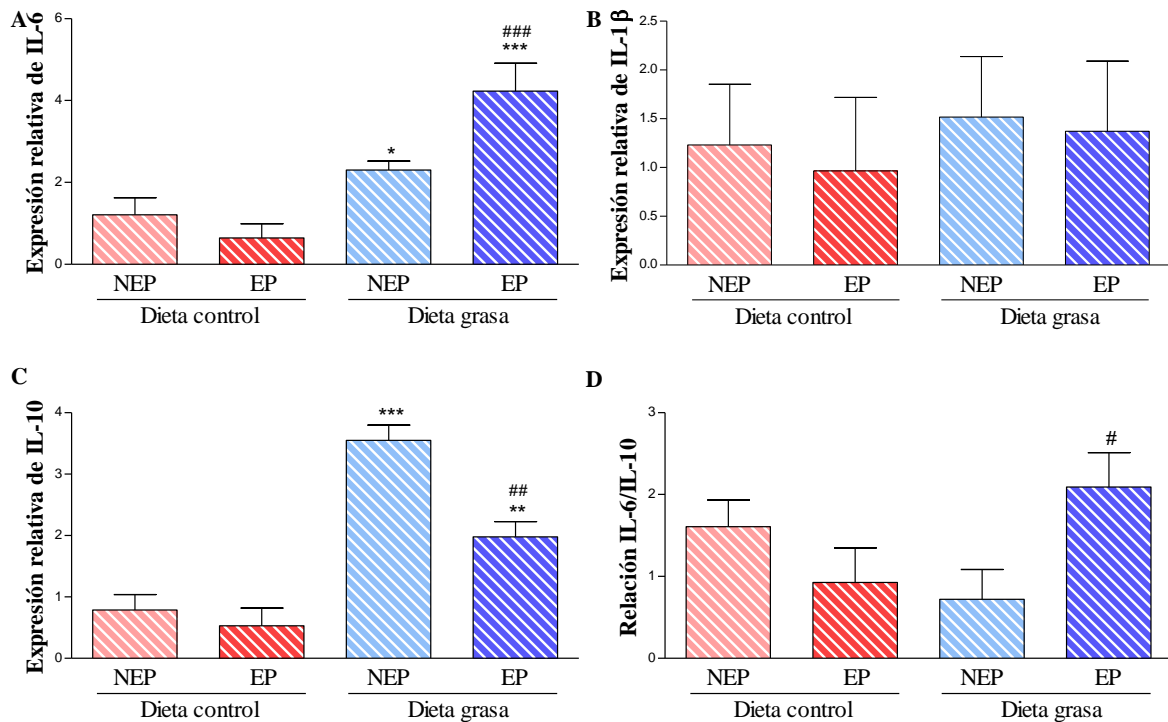


Figura 21: Expresión de citoquinas en el tejido adiposo. A: IL-6, B: IL-1 $\beta$ , C: IL-10 y D: relación IL-6/IL-10. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  mismo tratamiento prenatal dieta control (DC) vs dieta grasa (DG). # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  y ### $p < 0.001$  misma dieta estresados prenatalmente (EP) vs no estresados prenatalmente (NEP).

## Discusión

El microambiente intrauterino es crítico para el desarrollo fetal, perturbaciones en el mismo pueden tener consecuencias a corto y largo plazo en las crías. Gran cantidad de estudios demuestran que una amplia variedad de enfermedades metabólicas pueden originarse durante el desarrollo fetal (Tamashiro et al, 2009). Por eso, determinar los mecanismos que contribuyen a su desarrollo puede llevar a estrategias de tratamiento o intervenciones tempranas que permitan prevenir estos desórdenes.

Se ha observado que eventos estresantes durante la preñez temprana pueden producir abortos y malformaciones en la cría (Parker and Douglas 2010) debido posiblemente a altos niveles de GC, baja de progesterona, bajos niveles del factor bloqueador inducido por progesterona (PIBF), y/o baja producción de citoquinas tipo Th2. En nuestro modelo de estudio el estrés se aplica en la última semana de gestación. Este período se corresponde con el último trimestre en humanos, por lo cual se podrían descartar consecuencias importantes a nivel morfológico debidas al estrés. De este modo, los efectos observados deberían ser más sutiles que si el estresor se aplicara tempranamente en la preñez. Se ha encontrado que el estrés prenatal aplicado durante la última semana de gestación induce principalmente consecuencias a nivel metabólico y epigenético (Boersma and Tamashiro 2015; Talge et al, 2007). El estrés por inmovilización, que utilizamos en este trabajo, es ampliamente utilizado para estudiar las alteraciones inducidas por estrés a nivel fisiológico, inmunológico y neurobiológico en mamíferos (Glavin et al, 1994). Es importante señalar que en el presente trabajo no observamos diferencias en el número de crías nacidas, la relación entre sexos ni en el peso de las crías entre los tratamientos. Tampoco hubo diferencias en el tiempo de gestación. Si bien el período *in utero* fue posiblemente el más relevante en nuestro modelo, no podemos descartar el cuidado materno durante la lactancia como otro de los factores que podría afectar alguno de los parámetros estudiados, las madres estresadas podrían tener un comportamiento diferente y por tal razón descuidar a la cría. Esta falta de cuidado materno podría influir en el sistema inmune y endocrino de las crías (Champagne and Meaney 2006; Fish et al, 2004). Por eso, consideramos necesario en el futuro realizar estudios de intercambio de crías entre los tratamientos.

La cepa elegida para este experimento (C57BL/6J) es la más utilizada para evaluaciones metabólicas debido a que es susceptible a desarrollar trastornos metabólicos ante una amplia

variedad de dietas. Sin embargo, sin un tratamiento prenatal, se ha reportado que luego de 9 meses de ingesta de dieta grasa solo el 50% de los animales desarrolla obesidad y diabetes, los restantes desarrollan una de las dos enfermedades o ninguna de ellas (Burcelin et al, 2002).

En el presente trabajo, estudiamos el efecto del estrés por restricción del movimiento durante la última semana de gestación (días 15 a 21) en las crías de hembras C57BL/6J preñadas, las cuales al destete fueron alimentadas con una dieta control o con una dieta rica en grasas hasta la adultez. Observamos que la exposición al estrés en forma prenatal produce efectos metabólicos que se ponen en evidencia en la edad adulta, como el desarrollo de sobrepeso y alteraciones en la respuesta a la insulina. Estos efectos fueron sexo-específicos y en algunos casos solo fueron evidentes ante el desafío metabólico que implica la ingesta de una dieta rica en grasas.

En la bibliografía existen pocos trabajos enfocados en los efectos metabólicos del estrés prenatal en ratones. La gran mayoría utilizan ratas y usan otros protocolos de estrés, siendo los más populares la inyección de dexametasona y el estrés por restricción del movimiento por una o dos horas repetido varias veces al día en horarios aleatorios para evitar el acostumbramiento del animal.

En el modelo que hemos utilizado en este trabajo, no encontramos diferencias significativas en el peso al destete entre los diferentes tratamientos. En la bibliografía existen escasos trabajos que informen el peso al destete de los animales, resultados disímiles se han reportado en ratas, algunos autores reportan que el EP produce un peso corporal mayor a los controles (Tamashiro et al, 2009) y otros un peso menor (Lehmann et al, 2000).

En la curva de crecimiento, observamos un mayor efecto en los machos ya que los dos grupos alimentados con la dieta grasa mostraron un aumento de su peso corporal respecto de los de dieta control, pero los estresados prenatalmente lo hicieron a las 12 semanas de vida, mientras que en los no estresados prenatalmente este efecto se observó 10 semanas más tarde (a las 22 semanas de vida). En las hembras solo observamos aumento de peso corporal entre las estresadas prenatalmente y alimentadas con la dieta grasa, respecto del mismo tratamiento prenatal pero alimentadas con dieta control, y este efecto recién se observa a las 19 semanas de vida. Esto nos muestra que el estrés prenatal produce un efecto sensibilizador al desarrollo de sobrepeso ante la ingesta de una dieta rica en grasas. En un trabajo reciente, realizado en ratas Sprague-Dawley (SD) inyectadas diariamente durante la última semana de gestación con

dexametasona y cuyas crías luego son alimentadas con una dieta grasa, no se observaron efectos sobre el peso corporal de las crías debido al tratamiento prenatal (Sheen et al, 2016). Otro grupo, que estudió el efecto del estrés prenatal en ratas utilizando un modelo de estrés por restricción del movimiento 3 veces al día durante 45 minutos, a pesar de observar diferencias de peso al nacer, a los 24 meses de edad no observaron diferencias significativas entre los sometidos a estrés prenatal y el grupo control (Lesage et al, 2004), en dicho trabajo no se informan los pesos en tiempos previos a los 24 meses.

Para la evaluación del metabolismo de la glucosa en animales se realiza un test de tolerancia a la glucosa administrada en forma intraperitoneal u oral. Ambas vías de administración proveen información sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa de las células  $\beta$  pancreáticas además de la sensibilidad a la insulina del hígado y los demás órganos periféricos. El test por vía oral además, provee información sobre la secreción intestinal de las hormonas insulínótropas como GLP-1 y GIP pero posee mayor variabilidad debido al tiempo de vaciado gástrico que varía entre individuos. Dado que nuestro objetivo no involucraba la evaluación de las incretinas, realizamos el test por vía intraperitoneal, obteniendo alteraciones únicamente en los machos alimentados con dieta grasa. Asimismo, la curva de tolerancia a la glucosa en general se realiza sobre animales ayunados durante todo el periodo de oscuridad, esto implica no solo ayunarlos unas 12 horas sino hacerlo durante el periodo de mayor actividad en los roedores. Esto genera un importante estrés, lo que influye sobre los valores de glucemia basales obtenidos. Existen publicaciones que recomiendan realizar el ayuno durante solo 6 horas (debido a la alta tasa metabólica de los roedores) y en el periodo de luz de los animales, lo que genera menos estrés, afectando menos los resultados obtenidos (McGuinness et al, 2009). Por todo esto, nosotros decidimos al realizar el test de tolerancia a la glucosa, realizarlo mediante la administración intraperitoneal de glucosa y luego de 6 horas de ayuno.

Según los resultados obtenidos en la curva de tolerancia a la glucosa, en los machos, la homeostasis de glucosa fue alterada por la ingesta de dieta grasa independientemente de la exposición a estrés prenatal, fenómeno que no se observó en las hembras. Estos animales presentaron mayores valores de glucemia a los 60 y 120 minutos post administración de glucosa, esta alteración también se vio reflejada en el área bajo la curva. En este experimento observamos que a tiempos cortos post inyección (15 y 30 minutos) el organismo es capaz de manejar adecuadamente la hiperglucemia causada por la administración exógena de glucosa,

pero a los 60 minutos, cuando la glucemia de los animales control tiende a normalizarse, las crías macho alimentadas con dieta grasa no pueden mantener la homeostasis de la glucosa dentro de parámetros normales. En el trabajo mencionado anteriormente del Dr. Sheen y colaboradores (Sheen et al, 2016) los autores realizan una curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal y observan que las ratas macho alimentadas con la dieta rica en grasas y procedentes de madres tratadas con dexametasona durante la gestación presentan mayores niveles de glucosa a los 15 y 30 minutos post inyección lo que se refleja también en el AUC (Sheen et al, 2016). En ambos casos, los animales presentan intolerancia a la glucosa. En nuestros animales el pico de glucemia inicial ocasionado por la inyección es manejado del modo esperado por el organismo, por lo que luego del pico inicial la glucemia comienza a descender, el problema aparece cuando se han agotado los depósitos de insulina momento en el que el organismo no parece eficiente al sintetizar y secretar insulina de novo a la velocidad necesaria para mantener los niveles de glucosa dentro de parámetros normales. El problema también podría residir en la síntesis de alguna otra molécula clave al momento de ingresar glucosa a las células. En cambio los animales procedentes de madres tratadas con dexametasona parecen tener un problema en los primeros tiempos de la curva, lo que indicaría una inadecuada respuesta fisiológica al aumento de la glucosa en sangre (esto podría ser falta de respuesta en la secreción de insulina estimulada por glucosa o alguna alteración conformacional en el transportador de glucosa o en la vía de señalización de la misma).

Por otra parte, para la realización de la curva de tolerancia a insulina los animales no fueron ayunados debido a que, en roedores, el ayuno prolongado optimiza el efecto de la insulina (Andrikopoulos and others 2008; Ayala and others 2006; Halseth and others 1999; Ren and others 1995). Obtuvimos que entre las hembras alimentadas con dieta grasa, las EP tuvieron una glucemia más elevada que las NEP+DG a los 15 y 30 min post administración de insulina. En los machos, los EP+DG tuvieron la glucemia a los 15 min más elevada que los EP+DC. Además los machos que sufrieron estrés prenatal tuvieron mayor glucemia a los 30 y 60 minutos que sus respectivos controles. Tanto los machos estresados prenatalmente (de ambas dietas) como las hembras estresadas prenatalmente y alimentadas con dieta grasa presentaron insulino-resistencia, que se vio reflejada en los valores de glucemia más elevados obtenidos en este test. Existe un trabajo en ratas SD tratadas con dexametasona en forma prenatal y luego alimentadas



con dieta grasa en el que se observa valores de glucemia elevados en los animales con ambos tratamientos a los 60 min post inyección (Sheen and others 2016).

Si consideramos en conjunto los resultados de las curvas de tolerancia a la glucosa y a la insulina, observamos que los machos EP+DG presentan una respuesta alterada en ambos tests. Esto nos estaría indicando que estos animales, estresados prenatalmente y alimentados con una dieta rica en grasas desarrollan intolerancia a la glucosa e insulino-resistencia. Estas alteraciones pueden explicarse debido a que el estrés prenatal produce la reprogramación de la actividad del eje HPA y aumenta los niveles basales de GC (Maccari and others 2014; McIntyre and others 2012; Vargas and others 2016). Los glucocorticoides inducen insulino-resistencia reduciendo la expresión y fosforilación de IRS-1 (Sakoda and others 2000), de este modo desacoplan la señalización intracelular de los receptores de insulina y del factor similar a insulina tipo 1. Este efecto modera la actividad de proteínas involucradas en la señalización de insulina como PI3-K, PKB/AKT, lo que reduce la translocación a la membrana celular del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) en la mayoría de los tejidos (Beaudry and Riddell 2012).

En cuanto a los triglicéridos plasmáticos, los machos EP+DG tuvieron niveles de triglicéridos más elevados que los demás grupos, mientras que las hembras no mostraron alteraciones. En el colesterol, se observó un efecto conjunto de la dieta y el estrés prenatal en las hembras, mientras que en los machos se observó un aumento del colesterol total debido a la ingesta de dieta grasa, independientemente del tratamiento prenatal. No encontramos en la bibliografía trabajos en los que se midan colesterol o triglicéridos en modelos animales de estrés prenatal. Sin embargo, si esta reportado que ratones machos C57BL/6J alimentados por 56 días con una dieta rica en grasas (con un menor contenido de grasas que la que utilizamos nosotros), presentaron un aumento significativo del colesterol total y de los triglicéridos plasmáticos (Hu and others 2012).

Se encuentran frecuentemente reportadas en la bibliografía diferencias entre sexos en un amplio rango de modelos de programación fetal., tanto en modelos realizados sobre ratas como en ratones (Aiken and Ozanne 2013). Por ejemplo, se ha reportado que los machos son más susceptibles al desarrollo de hipertensión en modelos de programación fetal, este efecto se ha observado en ratas, en una amplia gama de intervenciones incluyendo la administración prenatal de dexametasona (Alexander 2003; Ortiz and others 2003). La variación de resultados

obtenidos entre los sexos muestran una vez más la amplia disparidad entre ambos, no solo ante la ingesta de la dieta grasa sino también ante una misma injuria sufrida durante el desarrollo prenatal, lo que sugiere que el dimorfismo sexual ante estas enfermedades debe ser estudiado con mayor profundidad.

Estudios recientes sugieren que la obesidad genera un estado de inflamación crónica de bajo grado que contribuye a la insulino-resistencia y a la diabetes tipo 2 (Greenberg and Obin 2006; Shoelson and others 2006). Si bien los tipos celulares implicados en esta respuesta pro-inflamatoria no son completamente conocidos, hay mucho interés en el rol de los MTAs en los cambios inflamatorios característicos de la obesidad (Neels and Olefsky 2006). Tanto en humanos como en ratones, estos macrófagos se acumulan en el tejido adiposo al aumentar el peso corporal y el número de estas células se correlaciona con medidas de insulino-resistencia (Canello and others 2005; Weisberg and others 2003; Xu and others 2003). Como se ha descrito en la introducción de esta tesis, los MTAs pueden polarizarse a un tipo 1 pro-inflamatorio o a un tipo 2 anti-inflamatorio. Los M1 secretan citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, mientras que los M2 secretan citoquinas anti-inflamatorias incluyendo IL-10 (Lumeng and others 2007). Diversos estudios sugieren que en la obesidad hay una desregulación de la polarización de los MTAs, en particular un desplazamiento desde el estado M2 hacia el estado M1 pro-inflamatorio (Fujisaka and others 2009; Lumeng and others 2007). También se ha demostrado que el balance M1/M2 está involucrado en la sensibilidad a la insulina (Patsouris and others 2008; Uysal and others 1997). Para contar con una aproximación de si existe una desregulación de este mecanismo en nuestro modelo experimental, se estudió la expresión de ARNm de citoquinas pro y anti-inflamatorias en tejido adiposo visceral. Cabe destacar que en sujetos obesos, el contenido de macrófagos es mayor en el tejido subcutáneo visceral que en el subcutáneo, consistentemente con la hipótesis de que la grasa visceral juega un rol más prominente en la insulino-resistencia (Canello and others 2006).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un aumento de la expresión génica de IL-6 debido a la ingesta de dieta grasa, este efecto se ve exacerbado al combinar ambos tratamientos, el estrés prenatal y la dieta grasa. Esto nos estaría indicando que la dieta grasa en los animales con EP produce una mayor respuesta inflamatoria que en los animales NEP que ingirieron la misma dieta. Cuando evaluamos la expresión génica de otra interleuquina inflamatoria como IL-1 $\beta$  no obtuvimos ninguna diferencia entre los tratamientos. Está

ampliamente descrito que la ingesta de una dieta rica en grasa produce inflamación, particularmente en el tejido adiposo, por lo que el aumento de expresión obtenido en IL-6 coincide con lo descrito en la literatura (McGillicuddy and others 2011).

Para evaluar la expresión de citoquinas anti-inflamatorias nos propusimos medir IL-4 e IL-10. La primera, no presentó valores detectables en nuestras muestras, por lo que no pudimos realizar esta determinación. En cuanto a IL-10, se observó un aumento significativo en su expresión en los animales alimentados con la dieta rica en grasas, con ambos tratamientos prenatales. Fujisaka y colaboradores (Fujisaka and others 2009) observaron un aumento de expresión de IL-10 tanto en adipocitos como en macrófagos de ratones obesos y postularon que la IL-10 podría estar involucrada en el reclutamiento de M2 en condiciones de dieta rica en grasa en ratones. Estos autores también discuten el rol de la IL-10 en la insulino-resistencia. Se ha reportado que esta citoquina mejora el ingreso de glucosa estimulado por insulina en adipocitos tratados con TNF- $\alpha$  (Lumeng and others 2007). Además, la sobreexpresión de IL-10 utilizando vectores adenovirales mejora la sensibilidad a la insulina tanto en una dieta estándar como en una dieta rica en grasas (Fujisaka and others 2009). Esto sugiere que la IL-10 secretada por los M2 contribuye no solo a los efectos anti-inflamatorios en el tejido adiposo sino también en la señalización de insulina en los adipocitos. Estas evidencias explicarían el aumento que nosotros observamos en esta citoquina en los animales tratados con la dieta rica en grasas. Este efecto probablemente se desencadene para compensar la respuesta pro-inflamatoria evidenciada por el aumento en IL-6 observado en estos animales. Cabe destacar que el grupo EP+DG presentó menor expresión de IL-10 que los NEP+DG indicando que la magnitud de la respuesta anti-inflamatoria es menor en los estresados prenatalmente. Los antecedentes mencionados podrían explicar la diferencia en cuanto a la sensibilidad a la insulina encontrada entre estos dos grupos experimentales basados en la expresión de IL-10.

Dado que tanto la expresión de ARNm de IL-6 como de IL-10 se vio aumentada en los animales alimentados con la dieta rica en grasas, se calculó la relación IL-6/IL-10 para determinar cuál de ellas aumentó más, y así evaluar si la respuesta dominante fue pro o anti-inflamatoria. Al realizar este cálculo, observamos que el grupo EP+DG presentaba una relación significativamente mayor que los ratones NEP+DG, indicando en estos animales una prevalencia del estado pro-inflamatorio por sobre el anti-inflamatorio. En este sentido,

concluimos que el estrés prenatal contribuiría al desarrollo de una respuesta pro-inflamatoria ante una alimentación rica en grasas.

## Conclusiones

Nuestros resultados indicaron que la exposición a estrés prenatal produjo alteraciones en la curva de respuesta a la administración de insulina, observándose una glucemia a los 60 minutos post inyección superior en los EP de ambas dietas, esto se vio reflejado en una área bajo la curva con valores más elevados que el resto de los grupos.

Cuando los animales además de sufrir estrés prenatal son expuestos a la ingesta de una dieta rica en grasa, los machos presentaron un mayor peso corporal. También presentaron niveles de triglicéridos plasmáticos más elevados que los demás grupos.

La ingesta de una dieta rica en grasas produjo algunas alternaciones no relacionadas con el estrés: las hembras EP+DG tuvieron mayor peso corporal que las alimentadas con dieta control. Los machos mostraron valores más elevados de glucemia (en la curva de tolerancia a la glucosa) a los 60 y 120 minutos y un aumento en el colesterol total por la ingesta de la dieta rica en grasas independientemente del tratamiento prenatal recibido.

Finalmente, este es el primer trabajo que evalúa los efectos metabólicos del estrés prenatal sobre la salud de las crías adultas realizado en ratones. Además, el desafío metabólico de la dieta rica en grasa evidenció alteraciones metabólicas en estos animales. También se observó un desbalance en la producción de citoquinas pro y anti-inflamatorias entre los diferentes tratamientos. Un mayor conocimiento de las vías implicadas en el impacto del estrés prenatal sobre la insulino-resistencia, considerando tanto procesos inmunológicos como metabólicos, proveerá nuevos enfoques terapéuticos en esta patología.

## Bibliografía

- Anon. 2013. Atlas de la diabetes de la Federación Internacional de Diabetes.
- Abdul Aziz NH, Kendall DA, Pardon MC. 2012. Prenatal exposure to chronic mild stress increases corticosterone levels in the amniotic fluid and induces cognitive deficits in female offspring, improved by treatment with the antidepressant drug amitriptyline. *Behav Brain Res* 231(1):29-39.
- Abildgaard A, Lund S, Hougaard KS. 2014. Chronic high-fat diet increases acute neuroendocrine stress response independently of prenatal dexamethasone treatment in male rats. *Acta Neuropsychiatr* 26(1):8-18.
- Aiken CE, Ozanne SE. 2013. Sex differences in developmental programming models. *Reproduction* 145(1):R1-13.
- Alexander BT. 2003. Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring. *Hypertension* 41(3):457-62.
- Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J. 2008. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(6):E1323-E1332.
- Ayala JE, Bracy DP, McGuinness OP, Wasserman DH. 2006. Considerations in the design of hyperinsulinemic-euglycemic clamps in the conscious mouse. *Diabetes* 55(2):390-7.
- Barker DJ. 1995a. Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today* 1(9):418-23.
- Barker DJ. 1995b. The fetal and infant origins of disease. *Eur J Clin Invest* 25(7):457-63.
- Barker DJ, Osmond C. 1986. Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the second world war. *J Epidemiol Community Health* 40(1):37-44.
- Barnes SK, Ozanne SE. 2011. Pathways linking the early environment to long-term health and lifespan. *Prog Biophys Mol Biol* 106(1):323-36.
- Beaudry JL, Riddell MC. 2012. Effects of glucocorticoids and exercise on pancreatic beta-cell function and diabetes development. *Diabetes Metab Res Rev* 28(7):560-73.
- Berthon BS, MacDonald-Wicks LK, Wood LG. 2014. A systematic review of the effect of oral glucocorticoids on energy intake, appetite, and body weight in humans. *Nutr Res* 34(3):179-90.

Boersma GJ, Moghadam AA, Cordner ZA and Tamashiro KL. 2014. Prenatal Stress and Stress Coping Style Interact to Predict Metabolic Risk in Male Rats. *Endocrinology* 155: 1302–1312.

Boersma GJ, Tamashiro KL. 2015. Individual differences in the effects of prenatal stress exposure in rodents. *Neurobiol Stress* 1:100-8.

Brown AS, Susser ES, Lin SP, Neugebauer R, Gorman JM. 1995. Increased risk of affective disorders in males after second trimester prenatal exposure to the Dutch hunger winter of 1944-45. *Br J Psychiatry* 166(5):601-6.

Buhl ES, Neschen S, Yonemitsu S, Rossbacher J, Zhang D, Morino K, Flyvbjerg A, Perret P, Samuel V, Kim J, Cline GW, Petersen KF. 2007. Increased hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and hepatic insulin resistance in low-birth-weight rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(5):E1451-E1458.

Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Roy-Tirelli A, Thorens B. 2002. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(4):E834-E842.

Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, Cunningham K, Esposito K, Jonsson LS, Kolb H, Lansink M, Marcos A, Margioris A, Matusheski N, Nordmann H, O'Brien J, Pugliese G, Rizkalla S, Schalkwijk C, Tuomilehto J, Warnberg J, Watzl B, Winklhofer-Roob BM. 2011. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr* 106 Suppl 3:S5-78.

Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumie A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clement K. 2005. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54(8):2277-86.

Canello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, Coussieu C, Basdevant A, Bar HA, Bedossa P, Guerre-Millo M, Clement K. 2006. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 55(6):1554-61.

Champagne FA, Meaney MJ. 2006. Stress during gestation alters postpartum maternal care and the development of the offspring in a rodent model. *Biol Psychiatry* 59(12):1227-35.

Cottrell EC, Holmes MC, Livingstone DE, Kenyon CJ, Seckl JR. 2012. Reconciling the nutritional and glucocorticoid hypotheses of fetal programming. *FASEB J* 26(5):1866-74.

Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumie A. 2004. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 53(5):1285-92.

Dalziel SR, Walker NK, Parag V, Mantell C, Rea HH, Rodgers A, Harding JE. 2005. Cardiovascular risk factors after antenatal exposure to betamethasone: 30-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet* 365(9474):1856-62.

De RB, Rungapamestry V, Ross K, Rucklidge G, Reid M, Duncan G, Horgan G, Toomey S, Browne J, Loscher CE, Mills KH, Roche HM. 2009. Attenuation of inflammation and cellular stress-related pathways maintains insulin sensitivity in obese type I interleukin-1 receptor knockout mice on a high-fat diet. *Proteomics* 9(12):3244-56.

Doyle LW, Ford GW, Davis NM, Callanan C. 2000. Antenatal corticosteroid therapy and blood pressure at 14 years of age in preterm children. *Clin Sci (Lond)* 98(2):137-42.

Drake AJ, Tang JI, Nyirenda MJ. 2007. Mechanisms underlying the role of glucocorticoids in the early life programming of adult disease. *Clin Sci (Lond)* 113(5):219-32.

Edwards CR, Benediktsson R, Lindsay RS, Seckl JR. 1993. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet* 341(8841):355-7.

Fasshauer M, Klein J, Lossner U, Paschke R. 2003. Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res* 35(3):147-52.

Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE. 2006. Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. *Physiol Behav* 88(3):234-43.

Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D. 2009. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 15(8):930-9.

Fish EW, Shahrokh D, Bagot R, Caldji C, Bredy T, Szyf M, Meaney MJ. 2004. Epigenetic programming of stress responses through variations in maternal care. *Ann N Y Acad Sci* 1036:167-80.



Franzek EJ, Sprangers N, Janssens AC, Van Duijn CM, van de Wetering BJ. 2008. Prenatal exposure to the 1944-45 Dutch 'hunger winter' and addiction later in life. *Addiction* 103(3):433-8.

Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M, Tobe K. 2009. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58(11):2574-82.

Glavin GB, Pare WP, Sandbak T, Bakke HK, Murison R. 1994. Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci Biobehav Rev* 18(2):223-49.

Goldstein DS. 2010. Adrenal responses to stress. *Cell Mol Neurobiol* 30(8):1433-40.

Greenberg AS, Obin MS. 2006. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr* 83(2):461S-5S.

Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78(3):783-809.

Gudsnuk K, Champagne FA. 2012. Epigenetic influence of stress and the social environment. *ILAR J* 53(3-4):279-88.

Hales CN, Barker DJ. 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35(7):595-601.

Halseth AE, Bracy DP, Wasserman DH. 1999. Overexpression of hexokinase II increases insulin and exercise-stimulated muscle glucose uptake in vivo. *Am J Physiol* 276(1 Pt 1):E70-E77.

Hoek HW, Brown AS, Susser E. 1998. The Dutch famine and schizophrenia spectrum disorders. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 33(8):373-9.

Hu X, Li Z, Xue Y, Xu J, Xue C, Wang J, Wang Y. 2012. Dietary saponins of sea cucumber ameliorate obesity, hepatic steatosis, and glucose intolerance in high-fat diet-fed mice. *J Med Food* 15(10):909-16.

Huh SY, Andrew R, Rich-Edwards JW, Kleinman KP, Seckl JR, Gillman MW. 2008. Association between umbilical cord glucocorticoids and blood pressure at age 3 years. *BMC Med* 6:25.

Ishii-Yonemoto T, Masuzaki H, Yasue S, Okada S, Kozuka C, Tanaka T, Noguchi M, Tomita T, Fujikura J, Yamamoto Y, Ebihara K, Hosoda K, Nakao K. 2010. Glucocorticoid

reamplification within cells intensifies NF-kappaB and MAPK signaling and reinforces inflammation in activated preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(5):E930-E940.

Jackson AA, Dunn RL, Marchand MC, Langley-Evans SC. 2002. Increased systolic blood pressure in rats induced by a maternal low-protein diet is reversed by dietary supplementation with glycine. *Clin Sci (Lond)* 103(6):633-9.

Juge-Aubry CE, Somm E, Giusti V, Pernin A, Chicheportiche R, Verdumo C, Rohner-Jeanraud F, Burger D, Dayer JM, Meier CA. 2003. Adipose tissue is a major source of interleukin-1 receptor antagonist: upregulation in obesity and inflammation. *Diabetes* 52(5):1104-10.

Koehl M, Darnaudery M, Dulluc J, Van RO, Le MM, Maccari S. 1999. Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *J Neurobiol* 40(3):302-15.

Koenig JI, Elmer GI, Shepard PD, Lee PR, Mayo C, Joy B, Hercher E, Brady DL. 2005. Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. *Behav Brain Res* 156(2):251-61.

Kosteli A, Sugaru E, Haemmerle G, Martin JF, Lei J, Zechner R, Ferrante AW, Jr. 2010. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest* 120(10):3466-79.

Langley-Evans SC. 1997. Hypertension induced by foetal exposure to a maternal low-protein diet, in the rat, is prevented by pharmacological blockade of maternal glucocorticoid synthesis. *J Hypertens* 15(5):537-44.

Lee PR, Brady DL, Shapiro RA, Dorsa DM, Koenig JI. 2007. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Res* 1156:152-67.

Lehmann J, Stohr T, Feldon J. 2000. Long-term effects of prenatal stress experiences and postnatal maternal separation on emotionality and attentional processes. *Behav Brain Res* 107(1-2):133-44.

Lemaire V, Koehl M, Le MM, Abrous DN. 2000. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20):11032-7.

Lesage J, Del-Favero F, Leonhardt M, Louvart H, Maccari S, Vieau D, Darnaudery M. 2004. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *J Endocrinol* 181(2):291-6.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25(4):402-8.

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117(1):175-84.

Lynch L, Nowak M, Varghese B, Clark J, Hogan AE, Toxavidis V, Balk SP, O'Shea D, O'Farrelly C, Exley MA. 2012. Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity* 37(3):574-87.

Maccari S, Krugers HJ, Morley-Fletcher S, Szyf M, Brunton PJ. 2014. The consequences of early-life adversity: neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations. *J Neuroendocrinol* 26(10):707-23.

Maccari S, Piazza PV, Kabbaj M, Barbazanges A, Simon H, Le MM. 1995. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J Neurosci* 15(1 Pt 1):110-6.

Mack I, BelAiba RS, Djordjevic T, Gorchach A, Hauner H, Bader BL. 2009. Functional analyses reveal the greater potency of preadipocytes compared with adipocytes as endothelial cell activator under normoxia, hypoxia, and TNF $\alpha$  exposure. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(3):E735-E748.

Mariana Costanzo MD, Gabriela Guercio MD PhD, Marta Ciaccio MD, Marco A Rivarola MD PhD and Alicia Belgorosky MD PhD. 2009. EVALUATION OF THE HYPOTHALMO:PITUITARY:ADRENAL AXIS IN PEDIATRICS. CUSHING SYNDROME. [Endocrinología Pediátrica On Line].

McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM. 2013. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:52.

McEwen BS. 1998. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 840:33-44.

McGillicuddy FC, Harford KA, Reynolds CM, Oliver E, Claessens M, Mills KH, Roche HM. 2011. Lack of interleukin-1 receptor I (IL-1RI) protects mice from high-fat diet-induced adipose tissue inflammation coincident with improved glucose homeostasis. *Diabetes* 60(6):1688-98.

McGuinness OP, Ayala JE, Laughlin MR, Wasserman DH. 2009. NIH experiment in centralized mouse phenotyping: the Vanderbilt experience and recommendations for evaluating glucose homeostasis in the mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(4):E849-E855.

McIntyre RS, Soczynska JK, Liauw SS, Woldeyohannes HO, Brietzke E, Nathanson J, Alsuwaidan M, Muzina DJ, Taylor VH, Cha DS, Kennedy SH. 2012. The association between childhood adversity and components of metabolic syndrome in adults with mood disorders: results from the international mood disorders collaborative project. *Int J Psychiatry Med* 43(2):165-77.

McLaughlin T, Liu LF, Lamendola C, Shen L, Morton J, Rivas H, Winer D, Tolentino L, Choi O, Zhang H, Hui Yen CM, Engleman E. 2014. T-cell profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(12):2637-43.

Misdrahi D, Pardon MC, Perez-Diaz F, Hanoun N, Cohen-Salmon C. 2005. Prepartum chronic ultramild stress increases corticosterone and estradiol levels in gestating mice: implications for postpartum depressive disorders. *Psychiatry Res* 137(1-2):123-30.

Morley-Fletcher S, Darnaudery M, Mocaer E, Froger N, Lanfumey L, Laviola G, Casolini P, Zuena AR, Marzano L, Hamon M, Maccari S. 2004. Chronic treatment with imipramine reverses immobility behaviour, hippocampal corticosteroid receptors and cortical 5-HT(1A) receptor mRNA in prenatally stressed rats. *Neuropharmacology* 47(6):841-7.

Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8(12):958-69.

Mulligan CJ, D'Errico NC, Stees J, Hughes DA. 2012. Methylation changes at NR3C1 in newborns associate with maternal prenatal stress exposure and newborn birth weight. *Epigenetics* 7(8):853-7.

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease N. 2017. Prediabetes and insulin resistance.

Nederhof E, Schmidt MV. 2012. Mismatch or cumulative stress: toward an integrated hypothesis of programming effects. *Physiol Behav* 106(5):691-700.

Neels JG, Olefsky JM. 2006. Inflamed fat: what starts the fire? *J Clin Invest* 116(1):33-5.

Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR. 1998. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest* 101(10):2174-81.

O'Brien K, Sekimoto H, Boney C, Malee M. 2008. Effect of fetal dexamethasone exposure on the development of adult insulin sensitivity in a rat model. *J Matern Fetal Neonatal Med* 21(9):623-8.

O'Regan D, Kenyon CJ, Seckl JR, Holmes MC. 2004. Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287(5):E863-E870.

Ortiz LA, Quan A, Zarzar F, Weinberg A, Baum M. 2003. Prenatal dexamethasone programs hypertension and renal injury in the rat. *Hypertension* 41(2):328-34.

Osborn O, Olefsky JM. 2012. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med* 18(3):363-74.

Parker VJ, Douglas AJ. 2010. Stress in early pregnancy: maternal neuro-endocrine-immune responses and effects. *J Reprod Immunol* 85(1):86-92.

Patsouris D, Li PP, Thapar D, Chapman J, Olefsky JM, Neels JG. 2008. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab* 8(4):301-9.

Pedersen BK. 2011. Muscles and their myokines. *J Exp Biol* 214(Pt 2):337-46.

Poulain-Godefroy O, Froguel P. 2007. Preadipocyte response and impairment of differentiation in an inflammatory environment. *Biochem Biophys Res Commun* 356(3):662-7.

Ren JM, Marshall BA, Mueckler MM, McCaleb M, Amatruda JM, Shulman GI. 1995. Overexpression of Glut4 protein in muscle increases basal and insulin-stimulated whole body glucose disposal in conscious mice. *J Clin Invest* 95(1):429-32.

Reynolds RM, Labad J, Strachan MW, Braun A, Fowkes FG, Lee AJ, Frier BM, Seckl JR, Walker BR, Price JF. 2010. Elevated fasting plasma cortisol is associated with ischemic

heart disease and its risk factors in people with type 2 diabetes: the Edinburgh type 2 diabetes study. *J Clin Endocrinol Metab* 95(4):1602-8.

Reynolds RM, Walker BR. 2003. Human insulin resistance: the role of glucocorticoids. *Diabetes Obes Metab* 5(1):5-12.

Reynolds RM, Walker BR, Syddall HE, Whorwood CB, Wood PJ, Phillips DI. 2001. Elevated plasma cortisol in glucose-intolerant men: differences in responses to glucose and habituation to venepuncture. *J Clin Endocrinol Metab* 86(3):1149-53.

Ruge T, Lockton JA, Renstrom F, Lystig T, Sukonina V, Svensson MK, Eriksson JW. 2009. Acute hyperinsulinemia raises plasma interleukin-6 in both nondiabetic and type 2 diabetes mellitus subjects, and this effect is inversely associated with body mass index. *Metabolism* 58(6):860-6.

Sakoda H, Ogihara T, Anai M, Funaki M, Inukai K, Katagiri H, Fukushima Y, Onishi Y, Ono H, Fujishiro M, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. 2000. Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. *Diabetes* 49(10):1700-8.

Sauter NS, Schulthess FT, Galasso R, Castellani LW, Maedler K. 2008. The antiinflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist protects from high-fat diet-induced hyperglycemia. *Endocrinology* 149(5):2208-18.

Sheen JM, Hsieh CS, Tain YL, Li SW, Yu HR, Chen CC, Tiao MM, Chen YC, Huang LT. 2016. Programming Effects of Prenatal Glucocorticoid Exposure with a Postnatal High-Fat Diet in Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* 17(4):533.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116(7):1793-801.

Smith ID, Shearman RP. 1974. Fetal plasma steroids in relation to parturition. I. The effect of gestational age upon umbilical plasma corticosteroid levels following vaginal delivery. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 81(1):11-5.

Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. 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(3):812-7.

St CD, 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* 294(5):557-62.

Stanner SA, Bulmer K, Andres C, Lantseva OE, Borodina V, Poteen VV, Yudkin JS. 1997. Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. *BMJ* 315(7119):1342-8.

Strissel KJ, DeFuria J, Shaul ME, Bennett G, Greenberg AS, Obin MS. 2010. T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Obesity (Silver Spring)* 18(10):1918-25.

Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. 2011. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 121(6):2094-101.

Talge NM, Neal C, Glover V. 2007. Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *J Child Psychol Psychiatry* 48(3-4):245-61.

Tamashiro KL, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JI, Moran TH. 2009. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes* 58(5):1116-25.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389(6651):610-4.

Van Dijk AE, Van EM, Stronks K, Gemke RJ, Vrijkotte TG. 2012. The relation of maternal job strain and cortisol levels during early pregnancy with body composition later in the 5-year-old child: the ABCD study. *Early Hum Dev* 88(6):351-6.

van EE, Gussekloo J, de Craen AJ, Frolich M, Bootsma-van der Wiel A, Westendorp RG. 2002. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes : the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes* 51(4):1088-92.

Vanitallie TB. 2002. Stress: a risk factor for serious illness. *Metabolism* 51(6 Suppl 1):40-5.

Vargas J, Junco M, Gomez C, Lajud N. 2016. Early Life Stress Increases Metabolic Risk, HPA Axis Reactivity, and Depressive-Like Behavior When Combined with Postweaning Social Isolation in Rats. *PLoS One* 11(9):e0162665.



Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. 2001. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 9(7):414-7.

Wang CT, Shui HA, Huang RL, Tai MY, Peng MT, Tsai YF. 2006. Sexual motivation is demasculinized, but not feminized, in prenatally stressed male rats. *Neuroscience* 138(2):357-64.

Ward AM, Fall CH, Stein CE, Kumaran K, Veena SR, Wood PJ, Syddall HE, Phillips DI. 2003. Cortisol and the metabolic syndrome in South Asians. *Clin Endocrinol (Oxf)* 58(4):500-5.

Watson JB, Mednick SA, Huttunen M, Wang X. 1999. Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. *Dev Psychopathol* 11(3):457-66.

Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. 2002. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 20:125-63.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112(12):1796-808.

Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. 2008. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 103(6):1372-9.

Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM. 2009. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 15(8):921-9.

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112(12):1821-30.