

**PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA**

**ANOMALÍAS HEPÁTICAS EN LOS FETOS  
Y LA DESCENDENCIA DE RATA  
ALIMENTADA CON UNA DIETA RICA EN  
GRASAS SATURADAS, ROL DE LA  
FUNCIÓN DE PPAR $\alpha$**

**Heinecke, María Florencia – LU: 1053089**

Licenciatura en Biotecnología

Tutora:

**White, Verónica, CEFyBO-CONICET-UBA**

Co-Tutor:

**Prada, Federico, UADE**

**Agosto 13, 2018**



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

## **AGRADECIMINETOS**

Quiero agradecer a las personas que me acompañaron en este camino y colaboraron para la realización de esta Tesina de Licenciatura:

A mi directora, la Dra. Verónica White por todo su amor y dedicación, por enseñarme todo lo que se con infinita paciencia y motivación, y por haber confiado en mi para realizar el trabajo.

A la Dra. Alicia Jawerbaum por su invaluable apoyo y enseñanza a lo largo de todo este tiempo en el laboratorio.

A todos mis compañeros de trabajo, Dai, Eva, Romi, Sabri, Dalmiro y Hugo, quienes me brindaron su cariño y ayuda desde el primer día y son los responsables de que haya disfrutado cada día de trabajo.

A todas las personas que forman parte del CEFyBO por acompañarme y ayudarme a realizar esta Tesina de Licenciatura.

A la Universidad Argentina de la Empresa y todos sus profesores por brindarme el conocimiento a lo largo de estos años, y a Federico Prada, director de la carrera, por su ayuda y predisposición.

A mis amigos que me regaló la facultad, Agos, Dolo, Majo, Sofi y Yamil, con quienes compartí días enteros de estudio y risas, quienes hicieron que ir a estudiar sea algo lindo.

A mis papas, por su amor eterno y su apoyo, por creer en mi y ayudarme a cumplir mis metas.

A mis hermanos, mis abuelos y toda mi familia por estar siempre presente y apoyarme.

## RESUMEN

La obesidad y el sobrepeso se definen como un exceso de peso producto de la acumulación de grasa debido a un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético. En la actualidad estas patologías presentan alta incidencia y las complicaciones asociadas afectan todos los órganos y sistemas. Los hijos de madre obesa desarrollan desde muy temprana edad un fenotipo hepático compatible con el hígado graso no alcohólico que se observa en pacientes adultos obesos. El receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales alfa (PPAR $\alpha$ ) activa la oxidación de lípidos y las defensas antioxidantes y por ello se han desarrollado agonistas farmacológicos que activan este receptor y así disminuir la sobreacumulación de lípidos en el hígado y otro órganos.

El objetivo de este trabajo fue estudiar si la obesidad materna programa alteraciones en el catabolismo de lípidos, generando daño hepático compatible con la enfermedad de hígado graso en los fetos y la descendencia de rata. Para ello, ratas hembras Wistar fueron alimentadas con una dieta rica en grasas saturadas de manera previa y durante la gestación y lactancia (grupo DGS). Se estudiaron los fetos en el día 21 de gestación y las crías adultas de 140 días alimentadas con alimento estándar desde el destete.

Los hígados de fetos y crías del grupo DGS presentaron niveles incrementados de perilipina 2 (Plin2) y 4-hidroxi-nonanal (4HNE), indicando sobreacumulación lipídica y daño pro-oxidante. Se evaluó la capacidad de clofibrato, un agonista farmacológico de PPAR $\alpha$  de inducir la oxidación de lípidos. En el grupo control el clofibrato redujo los niveles de lípidos e incrementó la expresión de ACO, CPT1 y Plin2, blancos de PPAR $\alpha$ . Sin embargo en el grupo DGS, el clofibrato no modificó los niveles de lípidos ni la expresión de ACO, CPT-1 y Plin2.

En este trabajo se evidencia que los fetos y la descendencia de rata con sobrepeso presentan un fenotipo similar a la enfermedad de hígado graso no alcohólico, con sobreacumulación de lípidos, sobreexpresión de proteínas involucradas en la incorporación-acumulación de lípidos y daño tisular por un ambiente pro-oxidante. Este trabajo muestra que en el caso en el que el fenotipo de hígado graso no alcohólico se desarrolla por programación materna, el tratamiento con fibratos podría no resultar efectivo.

## ABSTRACT

Obesity and overweight are defined as excess weight due to the accumulation of fat because of an imbalance between intake and energy expenditure. Currently, these pathologies have a high incidence and the associated complications affect all organs and systems. The children of obese mother develop from a very early age a hepatic phenotype compatible to the non-alcoholic fatty liver that is observed in man obese. The nuclear peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) activates lipid oxidation and antioxidant defenses and therefore pharmacological agonists have been developed that activate this receptor and thus decrease lipid overaccumulation in the liver and other organs.

The objective of this work was to study if maternal obesity programs alterations in lipid catabolism, generating liver damage compatible with fatty liver disease in fetuses and the offspring. To do this, female Wistar rats were fed with saturated fat rich-diet before and during pregnancy and lactation (SFD group). We studied the fetuses on day 21 of gestation and the adult offspring fed with a standard diet from weaning.

The livers of fetuses and offspring from the SFD group presented increased protein levels of perilipin 2 (Plin2) and 4-hydroxy-nonenal (4HNE), indicating lipid overaccumulation and pro-oxidant damage. Finally, the ability of clofibrate, a PPAR $\alpha$  pharmacological agonist, to induce lipid oxidation was evaluated. In the control group, clofibrate reduced lipid levels and increased the mRNA levels of ACO, CPT1 and Plin2, the three target genes of the activation of PPAR $\alpha$ . However, in the DGS group, clofibrate did not induce changes in lipid or mRNA levels.

It is evident in this work that fetuses and offspring of overweight rat have a phenotype similar to non-alcoholic fatty liver disease, with lipid overaccumulation, overexpression of proteins involved in the incorporation-accumulation of lipids and tissue damage by a pro-oxidant environment. This work shows that in the case in which the non-alcoholic fatty liver phenotype is developed by maternal programming, treatment with fibrates may not be effective.

## CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Obesidad y sobrepeso .....	1
1.1.1 Obesidad y metabolismo .....	3
1.1.2 Obesidad e inflamación .....	4
1.1.3 Obesidad e hígado .....	5
1.1.4 Obesidad y embarazo .....	6
1.1.5 Obesidad y cáncer .....	7
1.2 Programación metabólica .....	9
1.3 El hígado .....	11
1.3.1 Metabolismo hepático de ácidos grasos .....	13
1.3.2 Tráfico de ácidos grasos en el hígado .....	14
1.3.3 Lipogénesis .....	15
1.3.4 Oxidación mitocondrial de ácidos grasos .....	15
1.3.5 Oxidación peroxisomal de ácidos grasos .....	16
1.3.6 Almacenamiento de lípidos .....	17
1.3.7 Regulación génica del metabolismo hepático por los receptores activados por proliferadores peroxisomales .....	18
1.3.8 Programación de hígado graso .....	21
1.3.9 Antecedentes .....	22
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	27
3. METODOLOGÍA .....	29
3.1 Animales .....	29
3.1.1 Modelo de sobrepeso materno: diseño experimental .....	29
3.1.2 Estudio de los fetos a término de rata CT y DGS .....	31
3.1.2a Obtención del plasma materno y fetal, y de los hígados fetales .....	31
3.1.2b Estudio del efecto de la activación por PPAR $\alpha$ sobre el metabolismo de lípidos de hígados fetales CT y DGS .....	32
3.1.3 Estudio de la descendencia de rata CT y DGS .....	33

3.1.3a	Obtención del plasma e hígados .....	33
3.1.3b	Estudio del efecto de la activación por PPAR $\alpha$ sobre el metabolismo de lípidos en el hígado de la descendencia de rata CT y DGS .....	33
3.2	Efecto de la activación de PPAR $\alpha$ sobre los niveles lipídicos en hígados fetales y de la descendencia .....	34
3.3	Determinación de niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo de lípidos .....	35
3.4	Determinación de proteínas .....	39
3.5	Determinación de niveles proteicos mediante Western blot .....	39
3.6	Inmunohistoquímica .....	42
3.7	Análisis estadístico .....	43
4.	RESULTADOS .....	45
4.1	Caracterización del modelo dietario .....	45
4.2	Efectos de la dieta materna rica en grasas saturadas sobre el metabolismo materno y fetal .....	45
4.2.1	Efecto de la dieta rica en grasas saturadas sobre el peso y parámetros metabólicos en las madres y fetos al día 21 de gestación .....	45
4.2.2	Efecto de la dieta materna rica en grasas saturadas sobre el metabolismo del hígado de fetos al día 21 de gestación .....	49
4.2.2a	Expresión y localización de Plin2 en el hígado fetal de las ratas CT y DGS .....	49
4.2.2b	Niveles de 4HNE en el hígado fetal de ratas CT y DGS .....	51
4.3	Efecto de la dieta materna rica en grasas saturadas sobre el metabolismo de la cría de 140 días de edad .....	52
4.3.1	Efecto de la dieta rica en grasas saturadas en el peso corporal, el peso del hígado y parámetros metabólicos en las crías de 140 días de edad .....	52
4.3.2	Efecto de la dieta materna rica en grasas saturadas sobre el metabolismo del hígado de crías de 140 días de edad .....	53
4.3.2a	Niveles y expresión de Plin2 en el hígado de crías de 140 días de rata CT y DGS.....	53
4.3.2b	Niveles de 4HNE en el hígado de crías de 140 días de rata CT	

y DSG .....	56
4.3.2c Niveles proteicos de marcadores de hígado graso en el hígado de crías de 140 días de rata CT y DGS .....	57
4.4 Efectos de la activación de PPAR $\alpha$ sobre el metabolismo de lípidos de explantos de hígado de fetos de 21 días de gestación y de hígados de las crías de 140 días de edad del grupo CT y del grupo DGS .....	60
4.4.1 Determinación de la concentración óptima y especificidad para la activación de PPAR $\alpha$ .....	61
4.4.2 Efecto de la activación de PPAR $\alpha$ en el cultivo de explantos de hígado de fetos al día 21 de gestación provenientes del grupo CT y del grupo DGS ....	65
4.4.3 Efecto de la activación de PPAR $\alpha$ en el cultivo de explantos de hígado de crías de 140 días de edad provenientes del grupo CT y del grupo DGS .....	70
5. DISCUSIÓN .....	76
6. CONCLUSIÓN .....	82
7. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	84
BIBLIOGRAFÍA .....	85

## ABREVIATURAS

4HNE: 4-hidroxi-nonenal

ACC: acetil coenzima-A carboxilasa

ACO: acil-CoA oxidasa

AGL: ácidos grasos libres

AMPK: proteína quinasa activada por AMP

Col: colesterol

CPT-1: carnitina palmitoil transferasa 1

ECol: ésteres de colesterol

FABP4: proteína de unión a ácidos grasos 4

FAS: sintasa de ácidos grasos

FL: fosfolípidos

HDL: lipoproteína de alta densidad

IL-6: interleuquina-6

LCFA: ácidos grasos de cadena larga

LDL: lipoproteína de baja densidad

MnSOD: superóxido dismutasa manganeso

NAFLD: enfermedad del hígado graso no alcohólico

NRF $\kappa$ B: factor nuclear kappa de los linfocitos B

Plin2: perilipina-2

PPAR $\alpha$ : receptor activado por proliferadores peroxisomales alfa

PPAR $\delta$ : receptor activado por proliferadores peroxisomales delta

PPAR $\gamma$ : receptor activado por proliferadores peroxisomales gama

ROS: especies reactivas del oxígeno

TAG: triacilglicerol

TG: triglicéridos

TLC: cromatografía en capa delgada

TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Obesidad y sobrepeso

El sobrepeso y la obesidad son enfermedades crónicas que se definen por un exceso de peso (debido a la acumulación de masa grasa) con respecto al que le correspondería a una persona por su talla, sexo y edad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS): “El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud” (<https://www.who.int/es/>).

El sobrepeso y luego la obesidad son las consecuencias finales de un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético. Su etiopatogenia no es aún del todo bien conocida, habiéndose implicado en ella múltiples factores de tipo metabólico, hormonal, social, cultural y genético.

En el caso de los adultos, la OMS define el sobrepeso cuando el índice de masa corporal (IMC) es igual o superior a 25, y la obesidad cuando el IMC es igual o mayor a 30. El IMC es el parámetro antropométrico más utilizado mundialmente para realizar el diagnóstico de obesidad y sobrepeso. Se define como el peso del individuo, expresado en kilogramos, dividido por su talla al cuadrado, expresada en metros ( $\text{kg/m}^2$ ). En el caso de los niños, es necesario tener en cuenta la edad al definir el sobrepeso y la obesidad. El IMC proporciona la medida más útil del sobrepeso y la obesidad en la población, pues es la misma para ambos sexos y para los adultos de todas las edades. Sin embargo, hay que considerarla como un valor aproximado porque no diferencia el grado de adiposidad de la masa magra y no tiene en cuenta la corpulencia ósea ni la distribución regional de la grasa (Gil Hernández, 2010c).

Si bien el sobrepeso y la obesidad se consideraban un problema propio de los países de ingresos altos, actualmente ambos trastornos aumentan en los países de ingresos bajos y medianos, en particular en los entornos urbanos (Gil Hernández, 2010c). Actualmente, se considera a la obesidad y al sobrepeso como uno de los principales problemas de salud pública y son considerados por la OMS como una de las epidemias del siglo XXI por las dimensiones adquiridas en los últimos años y por su impacto sobre la calidad de vida.

La OMS provee la siguiente información (<https://www.who.int/es/>):

- Desde 1975, la obesidad casi se ha triplicado en todo el mundo.
- En 2016, más de 1900 millones de adultos de 18 años o más tenían sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos.
- En 2016, el 39% de las personas adultas de 18 años o más (un 39% de los hombres y un 40% de las mujeres) tenían sobrepeso, y el 13% (un 11% de los hombres y un 15% de las mujeres) eran obesas.
- En 2016, 41 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso o eran obesos.
- En 2016 había más de 340 millones de niños y adolescentes (de 5 a 19 años) con sobrepeso u obesidad.
- La obesidad puede prevenirse.

El sobrepeso y la obesidad son de las enfermedades metabólicas más prevalentes en el mundo desarrollado y constituyen una de las causas fundamentales del incremento de la morbimortalidad. Un IMC elevado constituye un factor de riesgo de múltiples enfermedades crónicas no transmisibles como la diabetes, la hipertensión vascular, la enfermedad cerebrovascular, los trastornos del aparato locomotor (principalmente la osteoartritis) y algunos cánceres (endometrio, mama, ovarios, próstata, hígado, vesícula biliar, riñones y colon) (Bray, 2004, Friedman, 2004). Además, tienen importantes repercusiones psicológicas, sociales y económicas en las personas que las padecen.

Por otro lado, es aún más preocupante la tasa de sobrepeso y obesidad infantil del mundo actual. La obesidad infantil es un problema mundial y está afectando progresivamente a muchos países de bajos y medianos ingresos, sobre todo en el medio urbano. La prevalencia ha aumentado a un ritmo alarmante. Cada aspecto adverso del entorno en que los niños se conciben, nacen y crecen puede agravar sus riesgos de padecer sobrepeso u obesidad. Los niños obesos o con sobrepeso tienden a seguir siendo obesos en la edad adulta y tienen más probabilidades de padecer enfermedades no transmisibles como la diabetes y las enfermedades cardiovasculares a edades tempranas (Gil Hernández, 2010c). Además, se asocian con una mayor probabilidad de muerte prematura, discapacidades en la edad adulta y algunos tipos de cáncer. Además de estos mayores riesgos futuros, los niños obesos sufren

dificultades respiratorias, mayor riesgo de fracturas e hipertensión, y presentan marcadores tempranos de enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina y alteraciones psicológicas (Gil Hernández, 2010c). La lactancia materna exclusiva desde el nacimiento hasta los seis meses de edad es un medio importante para ayudar a impedir que los lactantes se vuelvan obesos en la adultez (Ambrosini, 2014).

### **1.1.1. Obesidad y metabolismo**

La obesidad tiene origen multifactorial, es influenciada por la dieta, el estadio de desarrollo, la edad, la actividad física y los genes (Esposito et al., 2014, Riccardi et al., 2004).

En relación a las reservas de energía, hay una interacción compleja entre la regulación de la alimentación por parte del sistema nervioso central (SNC), particularmente en el hipotálamo, y la movilización de reservas de grasas corporales. Diversos neuropéptidos y neurotransmisores, junto con la insulina y la leptina interactúan en el hipotálamo, que regula la ingesta, el almacenamiento y el gasto energético, coordinando las respuestas conductuales, fisiológicas y metabólicas (Harrold et al., 2012, Heindel et al., 2017).

La insulina es una hormona proteica sintetizada en el páncreas, crucial en el metabolismo de la glucosa. En un estado fisiológico de insulinosensibilidad, posee la capacidad de disminuir las concentraciones de glucosa circulante, estimulando la utilización de glucosa en el músculo y el tejido adiposo, y suprimiendo la producción de glucosa en el hígado (Rui, 2014, Heindel et al., 2017).

A nivel del tejido adiposo, los adipocitos maduros sintetizan una serie de moléculas de naturaleza peptídica denominadas adipoquinas, que regulan la ingesta, la homeostasis energética, el metabolismo e intervienen en la respuesta inmune e inflamatoria. Algunas de estas son: leptina, adiponectina, resistina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleuquina 6 (IL-6), entre otros (Heindel et al., 2017). La leptina regula el apetito y el gasto energético a nivel del SNC. Además, de manera periférica, principalmente en el hígado, la leptina inhibe la síntesis de ácidos grasos mediante la acetil coenzima-A carboxilasa (ACC) a través de la activación de la AMPK (proteína quinasa activada por AMP) (Yi et al., 2013).

En la obesidad se produce una hiperplasia (proliferación) e hipertrofia (acumulación excesiva de lípidos) del adipocito que conduce a cambios en la secreción de adipocinas, que a su vez alteran la sensibilidad periférica a la insulina y provocan una inflamación crónica y un incremento de la aterosclerosis, aumentando el riesgo de enfermedad cardiovascular (Trayhurn, 2013, Heindel et al., 2017). Esta resistencia a la insulina resulta en la incapacidad de la hormona de activar la síntesis de glucógeno y de inhibir la síntesis de glucosa hepática (gluconeogénesis), lo que conduce a una mayor liberación y concentración de glucosa a la circulación. Si la resistencia a la insulina persiste y el páncreas disminuye su capacidad secretora de insulina puede desarrollarse Diabetes tipo 2 (Rui, 2014, Heindel et al., 2017).

### **1.1.2. Obesidad e inflamación**

Como consecuencia de la obesidad y el agrandamiento progresivo de los adipocitos, el suministro de sangre a los adipocitos se ve reducido, conduciendo a un estado de hipoxia en el tejido adiposo y a la activación de células inmunes residentes del tejido (Virtue and Vidal-Puig, 2010, Odegaard and Chawla, 2011). Así se genera un ambiente pro-inflamatorio debido a las sustancias pro-inflamatorias producidas por los adipocitos hipertrofiados y las producidas por células inmunes residentes. Es así que se reclutan más células inmunes que llegan al tejido inflamado y aumentando la cantidad de citoquinas inflamatorias secretadas por los macrófagos (Kalupahana et al., 2012). El factor nuclear kappa de los linfocitos B (NF $\kappa$ B) actúa como un sensor del estado redox de la célula. Su activación es desencadenada por numerosos estímulos como las citoquinas, factores de crecimiento y especies reactivas del oxígeno (ROS). Al ser activado, codifica genes diana de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$  (Marseglia et al., 2014). Estas citoquinas están implicadas en la patogénesis de la inflamación crónica en la obesidad e inducen la producción de ROS, generando estrés oxidativo y una aún mayor producción de citoquinas (Marseglia et al., 2014). De esta manera, se promueve un estado pro-inflamatorio y pro-oxidante caracterizado por un incremento en los lípidos depositados y circulantes, un incremento en la concentración de citoquinas pro-inflamatorias y un incremento de las ROS y sus derivados que inducen la oxidación de lípidos, proteínas e hidratos de carbono y la peroxidación de lípidos. La peroxidación lipídica involucra la participación de distintas ROS y los subproductos de la misma son marcadores de

daño por estrés oxidativo, entre los que se encuentra 4-hidroxi-nonenal (4HNE). Además, 4HNE es un mediador en la señalización inducida por estrés y es un segundo mensajero proapoptótico (Huang and Freter, 2015, Singhal et al., 2015). Tanto la oxidación como la peroxidación alteran las características físico-químicas de moléculas, y por lo tanto su actividad biológica, alterando la función del tejido afectado (Gil Hernández, 2010a).

Cuando el tejido adiposo almacena demasiados lípidos y llega a su saturación, los lípidos comienzan a almacenarse en tejidos no adiposos. En el músculo se observan adipocitos intramusculares, y en el corazón, el páncreas y el hígado se detecta una sobreacumulación de lípidos dentro de las células del órgano. También hay un incremento de grasa en la periferia de algunos órganos. Esta sobreacumulación lipídica induce la secreción de adipocinas pro-inflamatorias, que inducen estrés oxidativo y resistencia a insulina también en estos tejidos no adiposos (Guo, 2014, Marseglia et al., 2014).

### **1.1.3. Obesidad e hígado**

El hígado es un órgano central para el metabolismo de los lípidos. La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), caracterizada por una acumulación excesiva de triglicéridos dentro de los hepatocitos, y/o esteatosis, es considerada por algunos como la manifestación hepática de la obesidad y el síndrome metabólico (Cusi, 2012, Mendez-Sanchez et al., 2018). NAFLD es el término que describe varias anomalías hepáticas asociadas con la obesidad, que incluyen hepatomegalia, enzimas hepáticas elevadas e histología hepática anormal, como esteatosis, esteatohepatitis, fibrosis y cirrosis. A nivel hepático esta enfermedad se define por un incremento en la deposición de lípidos, la presencia de grandes gotas lipídicas, fibrosis, inflamación, vacuolización y daño tisular hepático por ROS. A nivel sistémico, se pueden observar elevados niveles de enzimas hepáticas como transaminasas, fosfatasa alcalina y bilirrubina, y ácidos biliares que señalan la disfunción hepática (Al-Rasadi et al., 2015). Además, el hígado graso no alcohólico se caracteriza por presentar resistencia a la insulina, y debido a ello es que la vía hepática de glucogenogénesis se encuentra inhibida y la de gluconeogénesis desinhibida, provocando una mayor liberación de glucosa en la circulación. Sin embargo, la vía lipogénica hepática no se altera por la

resistencia a la insulina, por lo que la síntesis de lípidos es estimulada por la gran disponibilidad de lípidos (Rui, 2014). En situaciones de insulino resistencia, la alta disponibilidad de ácidos grasos en circulación y la incrementada lipogénesis *de novo*, aumenta la esterificación de ácidos grasos en triglicéridos y ésteres de colesterol y su secreción dentro de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) alterando el perfil lipídico de la circulación (Lucero et al., 2015).

A menudo, los pacientes con NAFLD son obesos o tienen sobrepeso y son resistentes a la insulina (Heindel et al., 2017). En algunos informes nutricionales, se ha sugerido que las dietas altas en grasa, carbohidratos y/o colesterol son las principales causas de NAFLD. Aunque muchos pacientes con NAFLD muestran obesidad y/o insulinoresistencia, no todos los pacientes presentan estas características, pudiendo desarrollar la enfermedad de manera sub-clínica (Trovato et al., 2014).

#### **1.1.4. Obesidad y embarazo**

En la primera mitad del embarazo, el incremento de estrógeno y progesterona ocasionan una hiperplasia de las células  $\beta$  pancreáticas, aumentando la secreción de insulina. En tejidos periféricos, esto favorece la formación de depósitos de lípidos, inhibiendo la lipólisis (Gil Hernández, 2010b). En la segunda mitad del embarazo, hay un incremento de las hormonas con actividad prolactina y cortisol, que desencadena una resistencia a la insulina fisiológica. Se incrementa el catabolismo lipídico liberando ácidos grasos y cuerpos cetónicos a la circulación placentaria. De esta manera, los nutrientes se hallan disponibles para la nutrición, crecimiento y desarrollo fetal (Herrera et al., 2006).

Cuando la gestación ocurre en un ambiente obesogénico, caracterizado por la inflamación crónica, se agrava la resistencia a la insulina fisiológica y aumenta la cantidad de lípidos y nutrientes que van hacia el feto. En modelos animales y gestantes con obesidad, la descendencia presenta resultados variados en cuanto al peso, lo que aparentemente dependería de la capacidad placentaria de hacer frente al estado pro-oxidante y pro-inflamatorio para poder establecer un flujo sanguíneo y transporte de oxígeno y nutrientes necesarios para el crecimiento del feto (Jawerbaum and White, 2017).

### 1.1.5 Obesidad y Cáncer

Las personas con sobrepeso u obesidad tienen mayor riesgo de desarrollar otras enfermedades como patologías cardiovasculares o diabetes tipo 2, y hace unos años se empezó a relacionar que un mayor IMC es un factor de riesgo para el cáncer (Berger, 2014). Actualmente se encuentran en estudio algunos mecanismos biológicos que relacionan la implicancia de la obesidad con el mayor riesgo de padecer algún tipo de cáncer (Roberts et al., 2010, Berger, 2014). La obesidad se caracteriza por un estado inflamatorio crónico, lo que puede a largo plazo causar daño al ADN que puede conducir al cáncer. En la actualidad, el pensamiento más extendido es que las células tumorales utilizan la respuesta inflamatoria para su propio beneficio. Las células tumorales liberan señales químicas que atraen a macrófagos y granulocitos, células del sistema inmune presentes en la respuesta inflamatoria que liberan citoquinas en el interior del tumor. Las citoquinas liberadas por las células tumorales y de la respuesta inmune, promueven el desarrollo de vasos sanguíneos (angiogénesis) que servirán para llevar el oxígeno y los nutrientes que demandan las células tumorales para poder proliferar. Por último, las mismas citoquinas proinflamatorias, pueden inducir la migración de las células tumorales, confiriendo la característica metastásica de las células cancerosas. Otras citoquinas inducen la formación del estroma que sustenta al tumor. Además, en la respuesta inflamatoria se generan ROS, generando estrés oxidativo y dañando aún más el ADN de las células tumorales. En conjunto, se podría decir que el daño en el ADN es el origen de una célula tumoral y que la inflamación favorece y acelera su desarrollo hasta convertirse en cáncer propiamente dicho (Roberts et al., 2010, Berger, 2014).

Por otro lado, las personas obesas suelen tener mayores concentraciones de insulina en la sangre y del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1). Esta afección puede promover la formación de cáncer de colon, de riñón, de próstata y de endometrio (Roberts et al., 2010). En cuanto a las particularidades del tejido adiposo, los adipocitos producen adipocinas, que modulan la proliferación celular. La leptina, que parece promover la proliferación celular, aumenta su concentración en sangre con el aumento de la grasa corporal, y la adiponectina, que es menos abundante en las personas obesas, puede tener efectos antiproliferativos, como resultado, la obesidad promueve un estado proliferativo genera (Roberts et al., 2010). Además, el tejido adiposo produce cantidades en exceso de estrógeno, y altas concentraciones

de esta hormona se han asociado con mayores riesgos de cánceres de mama, de ovario, de endometrio y de algunos otros (Roberts et al., 2010).



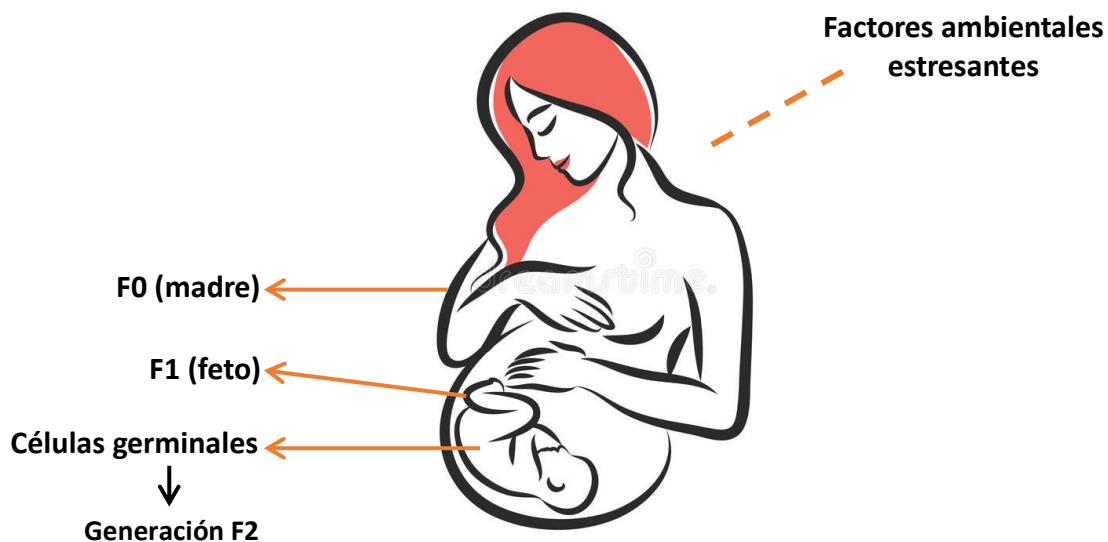
## 1.2. Programación metabólica

La hipótesis de la programación metabólica en el desarrollo fetal sugiere que el entorno de la vida temprana (concepción, embarazo, lactancia e infancia) influye en las características de los descendientes en etapas posteriores de la vida, incluida la susceptibilidad al desarrollo de la obesidad y trastornos metabólicos relacionados (Vickers, 2014). La creciente evidencia ahora indica que los efectos de la programación metabólica también pueden transmitirse a las generaciones futuras en ausencia de otros factores ambientales estresantes. David Barker fue quien inicialmente propuso la hipótesis de la existencia de una base fetal de la enfermedad adulta (Barker and Osmond, 1986) y ahora ha sido reformulada como la hipótesis de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (DOHaD). La hipótesis central DOHaD es que hay ventanas críticas durante el desarrollo y las interrupciones ambientales durante estas etapas de la vida pueden conducir a cambios sutiles en la expresión génica, organización de tejidos u otros niveles de organización biológica que llevan a una disfunción permanente que conduce a una mayor susceptibilidad a la enfermedad. A diferencia de los defectos congénitos y las enfermedades neonatales, estas disfunciones, si bien presentan indicadores tempranos, se manifiestan posteriormente en la vida adulta principalmente como una mayor vulnerabilidad a enfermedades comunes, incluida la obesidad (Vickers, 2014, Segovia et al., 2014). Barker y otros demostraron que los bebés con bajo peso al nacer como consecuencia de la malnutrición materna desarrollaron mayor susceptibilidad a las enfermedades en la vida adulta, incluyendo enfermedad coronaria, obesidad, apoplejía, diabetes tipo 2, osteoporosis, aumento de la presión arterial, dislipidemia, metabolismo alterado de la glucosa y disfunción metabólica (Barker et al., 1989, Barker et al., 1993, Barker, 2007).

La hipótesis de la programación en el desarrollo ha abierto un nuevo paradigma de investigación para comprender el riesgo de enfermedad crónica que va más allá de las explicaciones simplistas basadas en influencias genéticas y de estilo de vida. En vista de la creciente prevalencia de la obesidad en el embarazo y su asociación con diabetes gestacional, ahora también existe un interés creciente en la influencia perjudicial de la obesidad materna sobre el riesgo de enfermedad en la generación F1 y las siguientes generaciones (Drake and Seckl, 2011). Se han observado alteraciones en el metabolismo de la descendencia en modelos

experimentales de obesidad por la exposición durante la gestación y/o la lactancia, indicando la importancia de ambos períodos del desarrollo (Jawerbaum and White, 2017). Tanto la desnutrición materna como la obesidad materna conducen a una mayor adiposidad y trastornos metabólicos relacionados en la descendencia (Benyshek, 2013).

Cuando se aplica una perturbación a la madre (F0, por ejemplo, dieta materna alterada), afecta directamente al feto en desarrollo en el útero (F1) y también a las células germinales que formarán la generación F2 (**Esquema 1**). Datos muy limitados están disponibles en la generación F3 y más allá. Sin embargo, algunos estudios muestran el peligro de la programación transgeneracional y sus efectos nocivos en la cuarta descendencia (Drake and Seckl, 2011).



**Esquema 1:** Programación transgeneracional dada por un ambiente materno adverso.

Aunque la evidencia hasta la fecha indica que múltiples mecanismos están en juego en la interacción entre el desequilibrio nutricional y la transmisión transgeneracional de la obesidad y fenotipos metabólicos relacionados, es el papel de la epigenética el que ha ganado impulso en los últimos años. Los cambios epigenéticos proporcionan evidencia bioquímica de los efectos nocivos de las condiciones adversas durante el desarrollo y la enfermedad posterior, incluidas las enfermedades metabólicas (Trevino et al., 2015). Algunos aspectos de

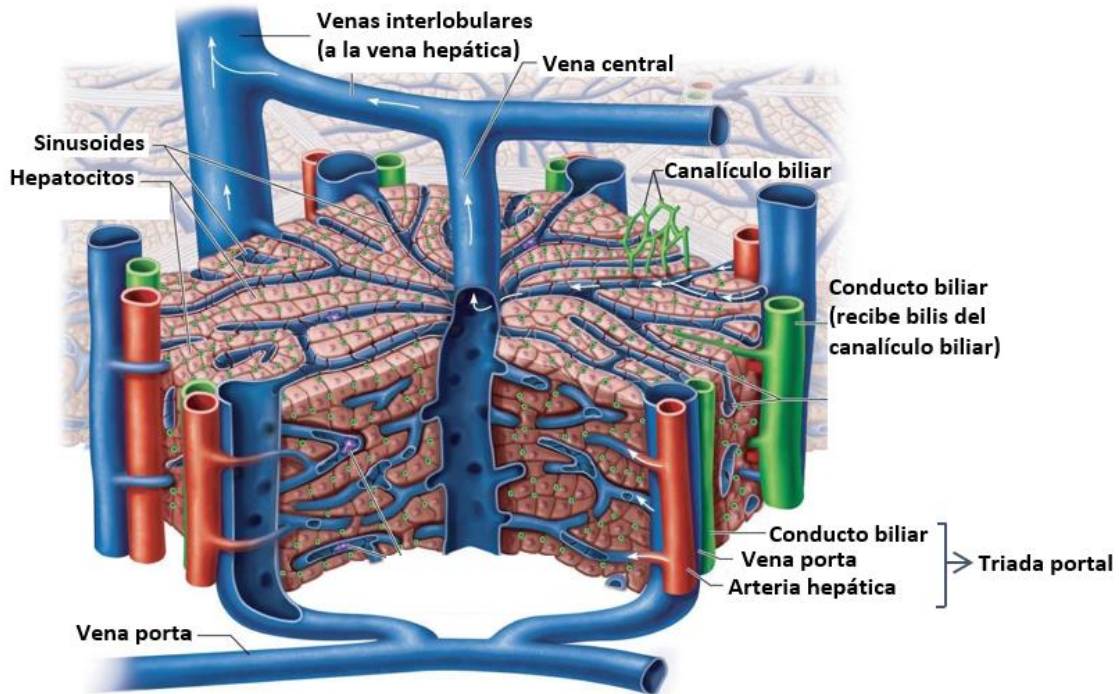
la señalización epigenética (por ejemplo, metilación del ADN, marcas de histonas, remodelación de cromatina y ARN no codificante) probablemente estén implicados en los mecanismos responsables de la alterada programación metabólica intrauterina en la obesidad.

### 1.3. El hígado

El hígado es un órgano metabólico clave que controla el metabolismo energético del organismo. Actúa como un centro metabólico que comunica a varios tejidos y órganos, incluidos el músculo esquelético y el tejido adiposo. Los alimentos se digieren en el tracto gastrointestinal y la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos se absorben en el intestino, pasan al torrente sanguíneo y se transportan al hígado a través del sistema de circulación de la vena porta (Abdel-Misih and Bloomston, 2010). El hígado recibe una cantidad de sangre equivalente a aproximadamente el 25% del gasto cardíaco (Malarkey et al., 2005). La vena porta, procedente del tubo digestivo y la arteria hepática, rama de la arteria aorta, son los dos principales sistemas vasculares que suministran sangre al hígado (Abdel-Misih and Bloomston, 2010). La vena porta suministra aproximadamente el 70% del flujo sanguíneo y el 40% del oxígeno, y contiene sangre poco oxigenada y rica en nutrientes; mientras que la arteria hepática suministra el 30% del flujo y el 60% del oxígeno (Malarkey et al., 2005).

La unidad funcional del hígado es el lobulillo hepático, en donde se pueden observar los hepatocitos, las principales células del tejido hepático. Entre las células, se encuentran el canalículo biliar y las sinusoides, capilares hepáticos formados por ramas finas provenientes de la vena porta y la arteria hepática. En los ángulos de los lobulillos hepáticos se sitúan las triadas portal, constituida por una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta y un conductillo biliar. La sangre proveniente tanto de la vena porta como de la arteria hepática se mezcla en las sinusoides hepáticas y abandona el órgano a través de las venas hepáticas, también llamadas suprahepáticas, que finalmente drenan en la vena cava inferior (**Esquema 2**). En la bilis se eliminan colesterol y el principal producto de su degradación, las sales biliares. La bilis se fabrica en el hígado, se almacena en la vesícula biliar y se libera en el intestino cuando se ingieren alimentos, en donde gran parte se reabsorbe. Gracias a la bilis es

posible la absorción de las grasas contenidas en los alimentos (Malarkey et al., 2005, Abdel-Misih and Bloomston, 2010).

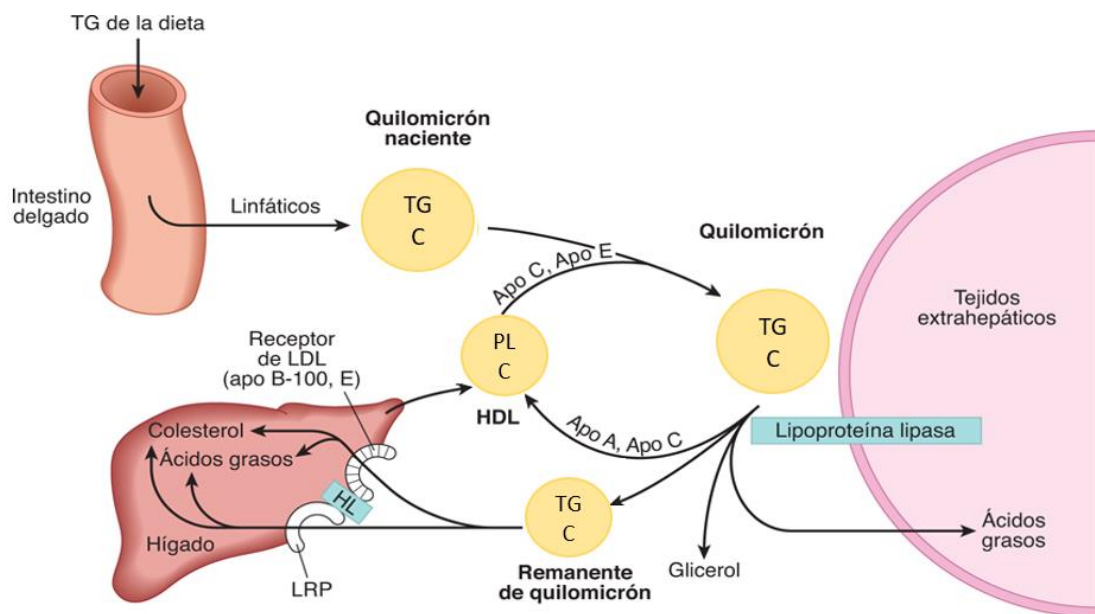


Esquema 2: Lobulillo hepático

El hígado se encarga de múltiples funciones, entre las que se incluyen: producción de la bilis necesaria para la digestión y absorción de nutrientes, metabolismo de carbohidratos (síntesis de glucógeno a partir de glucosa y degradación de glucógeno), metabolismo de lípidos (síntesis de colesterol, producción de triglicéridos, conversión de glúcidos y proteínas en ácidos grasos), metabolismo de proteínas (síntesis de albúmina, de factores de coagulación y de lipoproteínas para transportar ácidos grasos a través de la sangre, como VLDL, HDL y LDL), funciones inmunológicas, de detoxificación de la sangre y de almacenamiento de glucógeno, vitaminas y minerales (Malarkey et al., 2005). El metabolismo energético del hígado está estrechamente controlado. Se han identificado múltiples señales nutritivas, hormonales y neuronales que regulan el metabolismo de la glucosa, los lípidos y los aminoácidos en el hígado (Abdel-Misih and Bloomston, 2010, Rui, 2014). La disfunción de vías de señalización y del metabolismo hepático causa o predispone a la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) y promueve el desarrollo de diabetes tipo 2 (Rui, 2014).

### 1.3.1. Metabolismo hepático de ácidos grasos

Los hepatocitos reciben los ácidos grasos del torrente sanguíneo, en el cual están presentes los ácidos grasos que se liberan del tejido adiposo o se absorben de la digestión de alimentos en el tracto gastro intestinal. En los hepatocitos, los ácidos grasos se esterifican con glicerol 3-fosfato para generar triacilglicerol (TAG) o con colesterol para producir ésteres de colesterol. Los ésteres de TAG y colesterol se almacenan en gotas lipídicas dentro de los hepatocitos o se secretan en la circulación como partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Los ácidos grasos también pueden empaquetarse desde el intestino en lipoproteínas grandes y esféricas ricas en TAG llamadas quilomicrones, y ser transportados en circulación (**Esquema 3**) (Hussain, 2014). Los ácidos grasos también se incorporan en los fosfolípidos, que son un componente esencial de las membranas celulares, y en la capa superficial de las gotas de lípidos, las VLDL y las partículas biliares. En estado de ayuno, los ácidos grasos se oxidan principalmente en las mitocondrias para generar energía y cuerpos cetónicos (Rui, 2014, Heindel et al., 2017).



**Esquema 3:** Metabolismo de ácidos grasos. Fuente: Harper, Bioquímica ilustrada, 29ª edición:

[www.accessmedicina.com](http://www.accessmedicina.com) TG: Triglicéridos, C: Colesterol, PL: Fosfolípidos

Cuando los carbohidratos son abundantes, el hígado no sólo utiliza la glucosa como principal combustible metabólico, sino que también convierte la glucosa en ácidos grasos. En estados de sobrealimentación, la hiperglucemia provoca una hiperinsulinemia que favorece la síntesis hepática de ácidos grasos. La glucólisis genera piruvato, que puede ser transformado en la mitocondria primero en acetil-CoA y posteriormente en citrato. Éste sale al citosol, regenerándose en acetil-CoA, y es usado para sintetizar malonil-CoA que es sustrato de la sintasa de ácidos grasos (FAS) para sintetizar palmitato. La acumulación de malonil-CoA inhibe a la enzima carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT-1), inhibiendo la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. Los ácidos grasos no degradados son transformados en triglicéridos y posteriormente secretados en forma de VLDL (Rui, 2014).

Por el contrario, durante el ayuno los niveles de insulina descienden, favoreciendo la hidrólisis de los triglicéridos en el tejido adiposo a través de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, formando cuerpos cetónicos (principalmente acetoacetato y b-hidroxibutirato), los cuales son exportados por la circulación a los tejidos y consumidos cuando escasea la glucosa (principalmente en el cerebro). Además, en el hígado la ausencia de insulina provoca una disminución de la síntesis de ácidos grasos y de malonil-CoA, lo que desinhibe la  $\beta$ -oxidación. Por su parte, la glucogenogénesis se inhibe y la gluconeogénesis se desinhibe favoreciendo la liberación de glucosa a circulación (Gil Hernández, 2010a).

### **1.3.2. Tráfico de ácidos grasos en el hígado**

Los ácidos grasos provenientes tanto de la dieta como de la hidrólisis del tejido adiposo son transportados hacia el hígado por el torrente sanguíneo unidos a albúmina, en el caso de ácidos grasos libres, o a lipoproteínas, que incorporan triglicéridos, fosfolípidos y colesterol. Los ácidos grasos entran en los hepatocitos principalmente a través de CD36, proteína de transporte de ácidos grasos 2 (FATP2) y FATP4 (Abumrad et al., 1999, Kazantzis and Stahl, 2012). FATP2 y FATP4 median el transporte de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) no sólo hacia adentro de la célula, sino también adentro de los peroxisomas (Storey et al., 2012). Los LCFA comienzan su oxidación preferentemente en los peroxisomas y la finalizan en las mitocondrias, indicando una conexión entre ambas organelas (Demarquoy and



Le Borgne, 2015). Los LCFA se activan y convierten en LCFA-CoA mediante la acil-CoA sintetasa de cadena larga (ACSL). Las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) se unen a ambas LCFA y LCFA-CoA y actúan como vehículos de ácidos grasos intracelulares, lo cual facilita su solubilización y posibilita su transporte a los diferentes compartimentos celulares. Una de ellas es la proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4), involucrada en la absorción, transporte y metabolismo de ácidos grasos (Storch and Corsico, 2008, Mashek, 2013).

### 1.3.3. Lipogénesis

Los ácidos grasos se empaquetan en partículas de VLDL y se envían al tejido adiposo y otros tejidos extrahepáticos a través del torrente sanguíneo. La lipogénesis es el proceso de síntesis y se lleva a cabo en el citoplasma de todas las células. Los precursores son el acetil-CoA, proveniente de la glucólisis, de la degradación de aminoácidos o de las reservas de triglicéridos del propio tejido; ATP y NADPH, proveniente del ciclo de las pentosas fosfato. El acetil-CoA se carboxila mediante acetil-CoA carboxilasa (ACC) para formar malonil-CoA. Tanto el malonil-CoA como la NADPH se usan como precursores para sintetizar ácido palmítico (un ácido graso de 16 carbonos) mediante la sintasa de ácidos grasos (FAS). El ácido palmítico se alarga mediante miembros de la familia de la elongasa de acil-CoA en el retículo endoplasmático para generar LCFA (más de 16 carbonos) (Rui, 2014). En el hígado se produce la síntesis de triglicéridos a partir de ácidos grasos circulantes en el plasma o los sintetizados de novo. Tiene lugar en el retículo endoplásmico de la mayoría de las células del organismo, pero es en particular en los hepatocitos y en los adipocitos donde este proceso es más activo y de mayor relevancia metabólica. La síntesis de los mismos se relaciona con la secreción de VLDL, de las que los triglicéridos son parte mayoritariamente (Lewis, 1997, Lewis et al., 2002).

### 1.3.4. Oxidación mitocondrial de ácidos grasos

La  $\beta$ -oxidación mitocondrial es el proceso mayoritario de oxidación y se lleva a cabo mayoritariamente en el músculo y en el hígado. En el hígado, la oxidación sirve para obtener energía para otros procesos, como la gluconeogénesis, y para producir cuerpos cetónicos. La

$\beta$ -oxidación de los ácidos grasos de hígado es alta en ayunas y baja en el estado de alimentación.

Los LCFA se enlazan con la coenzima-A, reacción catalizada por la acil-CoA sintasa, para penetrar en la mitocondria. Para poder atravesar la membrana mitocondrial interna, los LCFA-CoA se deben conjugar con la carnitina, reacción catalizada por CPT-1. Los ácidos grasos de cadena corta pueden atravesar la membrana directamente hacia la matriz mitocondrial (Nguyen et al., 2008). Una vez en la mitocondria, los acil-CoA sufren el proceso de oxidación propiamente dicho, siendo degradados por una secuencia de reacciones de oxidación, hidratación y tiólisis (Rui, 2014). Como se menciona anteriormente, la ACC mitocondrial genera malonil-CoA y aumenta las concentraciones locales de malonil-CoA, lo que inhibe la actividad de CPT-1 y la  $\beta$ -oxidación, y asegura que en estado de alimentación se inhiba la oxidación de ácidos grasos (McGarry et al., 1977, Stefanovic-Racic et al., 2008). Los ácidos grasos saturados necesitan de isomerasas y reductasas para romper sus dobles enlaces y poder degradarse. La actividad de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCAD), enzima que cataliza el primer paso de oxidación, también está regulada a través de modificaciones postraduccionales. La delección de LCAD conduce a la esteatosis hepática y la resistencia a la insulina (Rui, 2014).

### 1.3.5. Oxidación peroxisomal de ácidos grasos

Los peroxisomas son orgánulos subcelulares de forma esférica, rodeados de una única membrana, sin estructura interna y que contienen muchas enzimas hidrolíticas. Se encuentran presentes y de forma abundante en todos los tejidos (Lodhi and Semenkovich, 2014).

Los peroxisomas pueden oxidar ácidos grasos muy diversos y otras sustancias con grupos acilo. La oxidación peroxisomal es también una  $\beta$ -oxidación, pero existen notables diferencias (Mannaerts et al., 2000). Así, no es necesaria la carnitina para la entrada de los ácidos grasos. La entrada de los ácidos grasos tiene lugar por proteínas de la familia denominada ABC (ATP binding cassette). Se requieren enzimas específicas como la acil-CoA oxidasa (ACO) en la segunda etapa de la oxidación en lugar de la deshidrogenasa, entre otras



(Gil Hernández, 2010a, Lodhi and Semenkovich, 2014). Sin embargo, tanto la oxidación mitocondrial como la peroxisomal generan energía en forma de ATP y poder reductor.

### 1.3.6. Almacenamiento de lípidos

El almacenamiento intracelular de lípidos proporciona protección contra los efectos tóxicos de las concentraciones excesivas de lípidos, una fuente de energía para el crecimiento celular y los procesos metabólicos, y una ventaja de supervivencia durante la inanición. La acumulación anormal de grasa intrahepática en forma de gotas lipídicas citoplásmicas es una característica fisiopatológica temprana del metabolismo hepático alterado que está relacionado con la resistencia a la insulina y la posible progresión a enfermedad hepática grave (Onal et al., 2017). Las gotas lipídicas son organelas subcelulares omnipresentes que almacenan lípidos. Su estructura se asemeja a la de las lipoproteínas circulantes en los mamíferos, que consiste en una monocapa de fosfolípidos que rodea un núcleo de lípidos neutros como triglicéridos y ésteres de colesterol (Khor et al., 2013, Ben M'barek et al., 2017). Aunque son más prominentes en los adipocitos, las gotas de lípidos están presentes en la mayoría de los tipos de células. Las gotas de lípidos varían mucho en tamaño, que van desde menos de 1  $\mu\text{m}$  a  $\sim 100 \mu\text{m}$  de diámetro. Los miembros de la familia de la perilipina (PLIN) se encuentran entre las proteínas asociadas a la gota lipídica más abundantes en las células de los mamíferos y funcionan como reguladores fisiológicamente importantes del metabolismo y el tráfico de lípidos celulares (Sztalryd and Kimmel, 2014). Los estudios de disrupción genética en ratones han documentado que se requiere perilipina-2 (Plin2, adipophilin, ADRP) para la acumulación de lípidos hepáticos en respuesta a la dieta con alto contenido de grasas (Crunk et al., 2013). La abundancia de Plin2 es directamente proporcional a los niveles de lípidos intracelulares que se encuentran dentro de las células y aumenta en enfermedades específicas que involucran la acumulación de grasa (Onal et al., 2017).

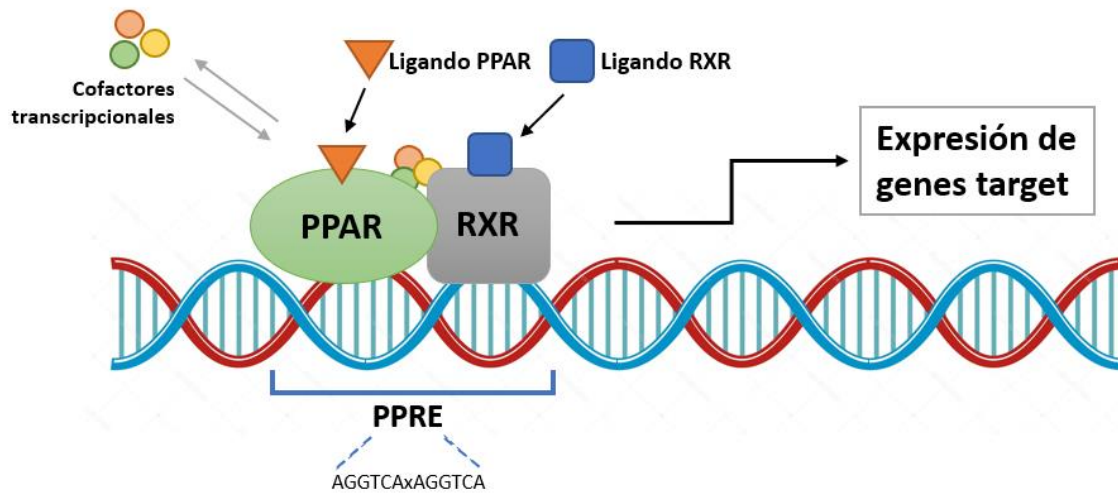
Debido a que los peroxisomas o las mitocondrias, y las gotas de lípidos controlan cada uno el flujo metabólico de lípidos, la interacción cercana entre los dos orgánulos sugiere una regulación coordinada del metabolismo y el tráfico de lípidos a través de sus límites. Cuando un organismo necesita energía, los ácidos grasos de cadena muy larga almacenados como

triglicéridos en las gotas de lípidos se pueden movilizar y transportar rápidamente a los peroxisomas para iniciar su oxidación (Khor et al., 2013).

### **1.3.7. Regulación génica del metabolismo hepático por los receptores activados por proliferadores peroxisomales**

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Se han identificado tres isoformas de PPAR,  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  y  $\gamma$ , las cuales son codificadas por genes diferentes. Los tres miembros de la familia PPAR manifiestan distintos patrones de distribución de tejido y perfiles de expresión de genes diana. Inicialmente se asoció a los PPAR con genes reguladores del metabolismo de los lípidos y la glucosa, pero también se los ha asociado a la regulación del crecimiento y la migración celular, y a la inflamación (Pyper et al., 2010, Grygiel-Górniak, 2014).

Los PPAR se reconocen como reguladores de fundamental importancia del metabolismo de los lípidos (Wang, 2010). Actúan como factores de transcripción activados por ligando que forman heterodímeros con los receptores retinoides X (RXR) y se unen a secuencias de ADN específicas conocidas como elementos de respuesta a PPAR (PPRE) ubicados en las regiones promotoras de los genes diana (**Esquema 4**). En ausencia de ligando, los PPAR se asocian con co-represores. La vinculación del ligando promueve un cambio de conformación en los PPAR, lo que resulta en el reemplazo de represores por co-activadores y la posterior activación de la expresión del gen diana (Berger and Moller, 2002, Pyper et al., 2010).



**Esquema 4:** Mecanismo de transcripción de genes por PPARs.

Los PPAR se expresan en todos los tejidos. El hígado y tejido adiposo marrón están altamente enriquecidos en PPAR $\alpha$ , el cual es un regulador clave de la oxidación de ácidos grasos. PPAR $\beta/\delta$  es el PPAR que se expresa más tempranamente en el embrión y en el hígado tiene una superposición funcional significativa con PPAR $\alpha$ . PPAR $\gamma$  es necesario para la diferenciación de tejido adiposo y para la lipogénesis y el almacenamiento lipídico. En el hígado, PPAR $\gamma$  induce la lipogénesis y está involucrado en la sobreacumulación de lípidos en la enfermedad hepática (Tontonoz and Spiegelman, 2008, Pyper et al., 2010, Grygiel-Górniak, 2014).

Se ha evidenciado que PPAR $\gamma$  es muy importante para el desarrollo placentario (Barak et al., 1999, Schaiff et al., 2000). Trabajos realizados en nuestro laboratorio indican que la activación de PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$  regulan la acumulación y transferencia placentaria de lípidos al feto en desarrollo, además de disminuir el daño tisular vinculado al estrés oxidativo en la gestación a término de rata (Kurtz et al., 2010, Capobianco et al., 2008).

PPAR $\alpha$  está principalmente expresado en tejidos donde el catabolismo de lípidos es importante, como el hígado, riñón, corazón y músculo. PPAR $\alpha$  es el regulador principal de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y la promueve tanto en las mitocondrias como en los peroxisomas (Kersten et al., 1999). La vía lipolítica hepática inducida por leptina es mediada

por PPAR $\alpha$ , que regula la expresión de genes clave en la  $\beta$ -oxidación de los lípidos, como ACO y CPT-1. La activación de PPAR $\alpha$  aumenta no sólo la expresión de genes de oxidación de ácidos grasos, sino también la abundancia de peroxisomas en el hígado (Janssen et al., 2015). Por otro lado, la activación de PPAR $\alpha$ , no solo induce el catabolismo lipídico, sino que posee muchos blancos de acción (Janssen et al., 2015, McMullen et al., 2014). Uno de sus blancos de acción, curiosamente, es Plin2, asociada a la sobreacumulación de lípidos (Janssen et al., 2015).

Además, los ligandos de PPAR $\alpha$  poseen actividad antiinflamatoria y antioxidante, inhibiendo la producción de interleukina-6 (IL-6) y prostaglandinas, y la expresión de ciclooxigenasa-2, como resultado de la represión de la señal de transcripción del NF $\kappa$ B. Los activadores del PPAR $\alpha$  también producen inhibición de los genes inducidos por citoquinas, tales como moléculas de adhesión vascular 1 (VCAM-1) y factor tisular en las células endoteliales. Más aún, la activación de PPAR $\alpha$  induce la expresión genes involucrados en la respuesta antioxidante como catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD). De esta manera, los productos de la oxidación de lípidos no generan daño tisular, sino que la activación de PPAR $\alpha$  coordina los eventos catabólicos con la respuesta antioxidante (Silva and Peixoto, 2018, Preidis et al., 2017). Se observó que la expresión de PPAR $\alpha$  se encuentra en algunos casos disminuida en la enfermedad de hígado graso generando una disminución de los procesos de oxidación de ácidos grasos (Mei et al., 2015, Jang et al., 2012).

PPAR $\alpha$  tiene como ligandos endógenos al leucotrieno B4 y los ácidos grasos, y se han desarrollado potentes activadores como los fibratos. En particular, la industria farmacéutica ha desarrollado al clofibrato para su uso terapéutico (Grygiel-Górniak, 2014). El mecanismo de acción de clofibrato se basa en reducir los niveles de lipoproteínas ricas en triglicéridos, tal como las VLDL, al aumentar su catabolismo por un incremento en la actividad extrahepática de la lipoproteinlipasa y reducir su síntesis a nivel hepático. Es indicado terapéuticamente para reducir una hipercolesterolemia o hiperlipidemia; arteriosclerosis en todas sus formas; dolencia cardíaca coronaria (isquemia), dolencias vasculares cerebrales o periféricas; hiperlipidemia con xantomatosis o sin ella; arteriopatía diabética, en especial retinopatía exudativa (<https://www.vademecum.es/principios-activos-clofibrato-c10ab01>).

Durante la gestación, PPAR $\alpha$  induce el catabolismo de lípidos en el hígado de fetos y placentas en día 14 y en el hígado de fetos y placentas de rata de día 21 de gestación, regulando el crecimiento fetal (Martinez et al., 2011a, Martinez et al., 2008, Martinez et al., 2011b).

Entonces la activación de PPAR $\alpha$  es un punto clave en la regulación del metabolismo de lípidos hepáticos. El estudio de estas regulaciones es importante para el diseño de estrategias para el tratamiento de las enfermedades metabólicas que afectan el hígado y así mejorar la calidad de vida de los individuos.

### **1.3.8 Programación de hígado graso**

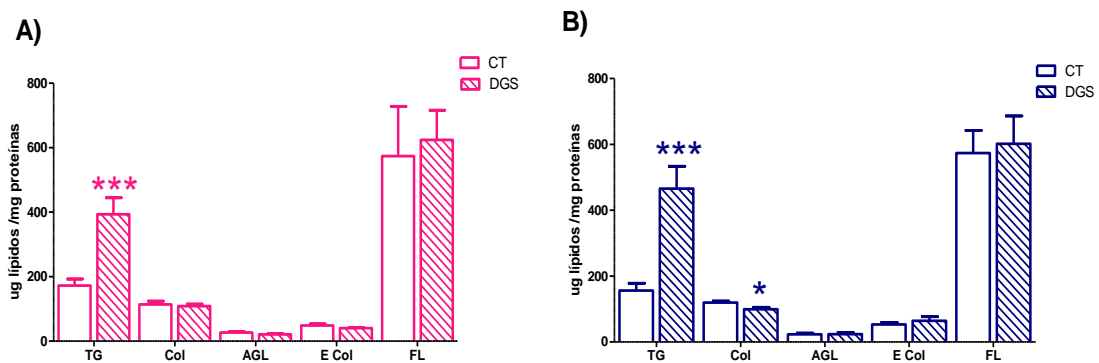
Los cambios en el entorno nutricional de la madre durante el desarrollo fetal pueden influir en el riesgo metabólico de la descendencia en etapas posteriores de la vida. Los modelos animales han demostrado que las crías de las madres con obesidad inducida por la dieta desarrollan complicaciones metabólicas, incluida la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) (Alfaradhi et al., 2014). La nutrición alterada en la primera infancia, además de aumentar el riesgo de desarrollar obesidad, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares en la descendencia, ahora se asocia con un mayor riesgo para el desarrollo de NAFLD. En las últimas décadas ha habido una creciente evidencia que sugiere que un ambiente obesogénico materno puede contribuir a la obesidad y el síndrome metabólico de las crías (Li et al., 2015).

Los posibles mecanismos implicados en la programación de NAFLD son la sobreacumulación lipídica en el hígado, la disfunción mitocondrial generando estrés oxidativo y la secreción de citoquinas proinflamatorias (Li et al., 2015). La característica principal de NAFLD es la acumulación de lípidos que ocurre cuando la absorción de ácidos grasos y la síntesis exceden la capacidad oxidativa de los hepatocitos. La acumulación de grasa en el hígado fetal puede originarse directamente de la transferencia de lípidos de la madre y representa un "primer golpe" de lipotoxicidad durante el desarrollo de la vida temprana (Gregorio et al., 2010).

### 1.3.9 Antecedentes

En estudios previos de nuestro laboratorio, se desarrolló un modelo de sobrepeso en ratas gestantes mediante la alimentación con una dieta rica en grasas. Se trabajó con dos grupos: un grupo control (CT) alimentado con una dieta comercial estándar (5% de grasa), y un grupo alimentado con la dieta comercial estándar suplementada con un exceso de grasas saturadas (25% de grasas provenientes de la manteca) (DGS). Luego de ser apareadas con machos control, cada grupo continuó con su respectiva dieta, se sacrificaron las madres y se obtuvieron los fetos al día 21 de gestación o se dejaron nacer las crías y se sacrificaron a los 140 días de edad.

Los fetos de 21 días de gestación del grupo DGS presentaron incrementos de peso y de niveles de triglicéridos y colesterol con respecto al grupo CT. Además, se encontró una sobreacumulación de triglicéridos en los hígados de fetos hembra y macho provenientes de las ratas alimentadas con un exceso de grasas saturadas al compararlos con el grupo control (Figura 1) (Mazzucco et al., 2013).



**Figura 1:** Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en el hígado de fetos A) hembras y B) machos de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). \*p-valor<0,05 \*\*\*p-valor<0,001 con respecto al control. n=6. Test estadístico: t-student. TG: triglicéridos, Col: colesterol, AGL: ácidos grasos libres, E Col: ésteres de colesterol, FL: fosfolípidos.

Se encontraron niveles incrementados de leptina en el plasma de madres y fetos de ambos sexos del grupo DGS respecto del grupo control. Dado que en el feto de rata no hay tejido adiposo diferenciado, y que el hígado expresa y produce leptina, se estudiaron los

niveles de ARN mensajero de leptina en este tejido para conocer la producción local de la hormona y su potencial accionar. Se observó que la dieta materna con exceso de grasas saturadas induce un aumento de los niveles de ARN mensajero de leptina, de su receptor y la expresión proteica de su receptor en el hígado de fetos hembra y macho. Es así que estos hígados se encuentran expuestos a altos niveles de leptina circulante y a un ambiente hiperlipídico (Mazzucco et al., 2013).

Como se ha mencionado, la leptina regula la expresión de numerosos genes involucrados en el catabolismo de lípidos (Wein et al., 2007). Mediante la activación de PPAR $\alpha$ , la leptina induce la expresión de acil-CoA Oxidasa (ACO) y carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT-1), enzimas lipolíticas claves en los procesos de  $\beta$ -oxidación mitocondrial y peroxisomal, respectivamente (Lee et al., 2002). Es por esto que resultó llamativo que, a pesar de los incrementados niveles de leptina en circulación y la elevada expresión de su receptor en los hígados fetales del grupo DGS, estos órganos presentaron acumulación de lípidos. Se analizaron entonces los niveles de ARN mensajero de algunos genes involucrados en el catabolismo lipídico de este órgano. No se encontraron diferencias en los niveles de ARN mensajero ni de proteína de PPAR $\alpha$  al comparar los dos grupos dietarios estudiados. Sin embargo, se observó una disminución de los niveles de ARN mensajero de ACO y CPT-1 en el hígado de fetos hembra y macho del grupo DGS respecto del grupo control (Mazzucco et al., 2013). Estos resultados, que podrían explicar la sobreacumulación lipídica en los fetos del grupo DGS, no concordaban con un ambiente hiperleptinémico, lo que dio origen a los estudios que se presentan más adelante.

Los ambientes hiperlipémicos inducen un ambiente pro-inflamatorio y pro-oxidante que genera daño tisular (Marseglia et al., 2014). Los hígados fetales del grupo DGS presentaron una elevada producción de óxido nítrico y de nitración proteica, parámetros indicadores de estrés oxidativo y nitrativo. Además, el índice HOMA, indicador de resistencia a la insulina, se encontró levemente incrementado en madres y fetos del grupo DGS respecto del grupo CT (Mazzucco et al., 2016).

Con el objetivo de evaluar si las alteraciones mencionadas persistían en la progenie en la etapa post natal, se estudió la descendencia adulta del modelo. Para ello, se dejó nacer a la descendencia de ratas preñadas tanto del grupo CT como del grupo DGS. Durante la lactancia



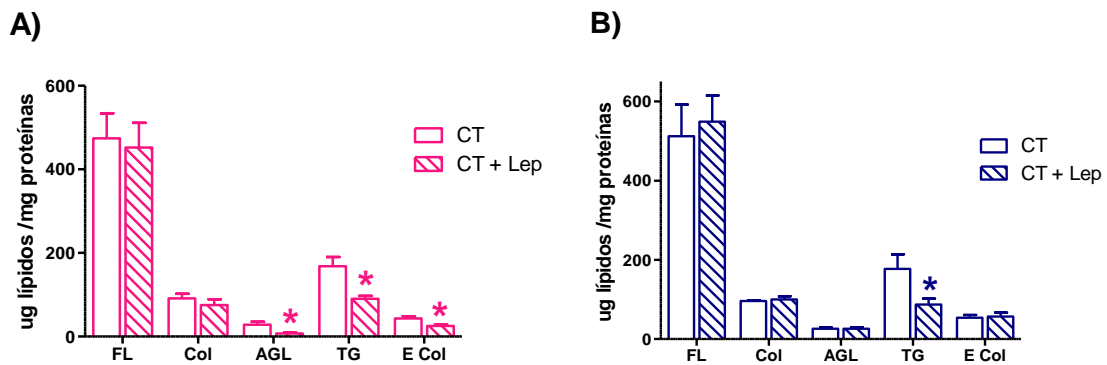
se continuó con las dietas correspondientes, y el día del destete, correspondiente al día 21 posnatal, todas las crías fueron separadas de sus madres y alimentadas con dieta control. Se sacrificaron las crías al día 140 post natal y se obtuvieron los plasmas y los hígados. Al igual que lo observado en el hígado fetal, se observó una sobreacumulación de lípidos en el hígado de las crías tanto hembra como macho de 140 días de edad provenientes del grupo DGS en relación al grupo CT (Mazzucco et al., 2016). Nuevamente, al evaluar los genes involucrados en el catabolismo de los lípidos, se encontró que la dieta materna con exceso de grasas saturadas producía una disminución de los niveles de ARN mensajero de ACO y CPT-1 en los hígados de las crías, en relación al grupo CT. No se observaron diferencias en los niveles de ARN mensajero de PPAR $\alpha$  al comparar los hígados de las crías provenientes de los grupos dietarios en estudio (Mazzucco et al., 2016). Como la expresión de CPT-1 y ACO se encuentra regulada por la actividad de PPAR $\alpha$  (Pyper et al., 2010), la disminución de ACO y CPT-1 de manera independiente de los niveles de PPAR $\alpha$  indicaría una disminución de la actividad de PPAR $\alpha$  en el grupo DGS. Al igual que lo sugerido en el caso del hígado fetal del grupo DGS, se podría suponer que la disminución de la expresión de las enzimas lipolíticas ACO y CPT-1 estaría involucrada en la sobreacumulación de triglicéridos hepática de las crías.

También se detectó mayor producción de óxido nítrico y mayores niveles de proteínas nitradas en los hígados de crías del grupo DGS respecto de los hígados de crías provenientes del grupo CT, parámetros indicadores de daño por estrés oxidativo y nitrativo (Mazzucco et al., 2016).

La disminución de los niveles de ARN mensajero de ACO y CPT-1 en el hígado de fetos del grupo DGS, en presencia de hiperleptinemia fetal y elevados niveles del receptor de esta hormona, como también la disminución de ARN mensajero de ACO y CPT-1 en el hígado de la descendencia adulta del grupo DGS, sugerían una resistencia a la leptina en este órgano, probablemente inducida por una programación intrauterina debido a la afluencia incrementada de grasas. Con el objetivo de indagar acerca de la posible resistencia a la leptina en el hígado fetal del grupo DGS, se cultivaron los hígados fetales de este grupo y del control en presencia y en ausencia de leptina y estudiamos el efecto de la hormona sobre algunos de sus genes blanco involucrados en el catabolismo de lípidos.

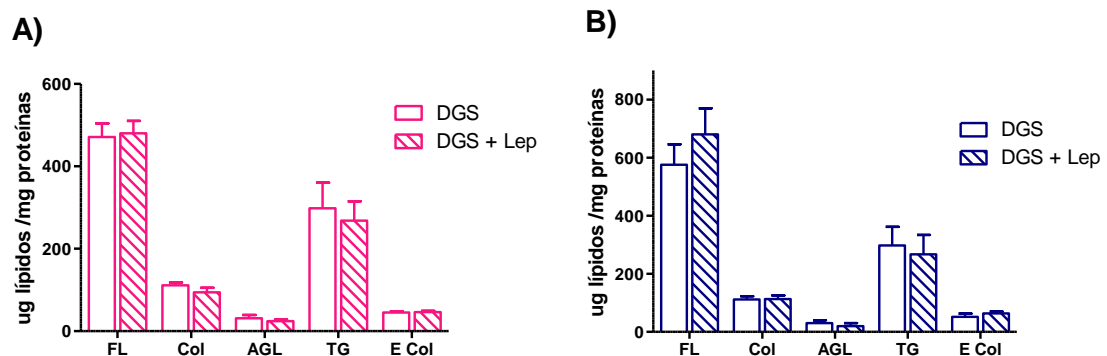


Al cultivar los hígados fetales del grupo control en presencia de leptina se observó el conocido efecto lipolítico de esta hormona, el cual se tradujo en la disminución de los niveles de triglicéridos tanto en hígado de fetos hembra como macho (**Figura 2**). En el caso de las hembras, también se detectó una disminución de los niveles de ácidos grasos libres y ésteres de colesterol (**Figura 2**) (Mazzucco et al., 2016).



**Figura 2:** Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en hígados fetales A) hembra y B) macho de 21 días de gestación proveniente de ratas del grupo control cultivados en presencia de 100ng/ml de leptina (CT + Lep) o sin adiciones de leptina (CT). \*p-valor<0,05 con respecto al control sin adiciones. n=6. Test estadístico: t-Student. TG: triglicéridos, Col: colesterol, AGL: ácidos grasos libres, E Col: ésteres de colesterol, FL: fosfolípidos.

A diferencia de lo observado en el grupo control, no se observó un efecto de la leptina en la modulación de los niveles de lípidos hepáticos en los fetos hembra y macho provenientes del grupo DGS (**Figura 3**).



**Figura 3:** Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en hígados fetales A) hembra y B) macho de 21 días de gestación proveniente de ratas del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas cultivados en presencia de 100ng/ml de leptina (DGS + Lep) o sin adiciones de leptina (DGS). n=6. Test estadístico: t-Student. TG: triglicéridos, Col: colesterol, AGL: ácidos grasos libres, E Col: ésteres de colesterol, FL: fosfolípidos.

El cultivo con leptina produjo el esperado aumento en los niveles de ARN mensajero de ACO y CPT-1 en los hígados fetales hembra y macho provenientes del grupo CT que no se observó en los hígados provenientes del grupo DGS (Mazzucco et al., 2016).

No se observó modulación de la expresión de PPAR $\alpha$  por leptina en los hígados del grupo control ni del grupo DGS, lo que una vez más sugiere que esta hormona induciría la transcripción de ACO y CPT1 a través de la modulación de la actividad de PPAR $\alpha$ . La leptina no indujo cambios en los niveles del receptor de leptina (ObR) en ninguno de los grupos dietarios, indicando que la ausencia de respuesta a leptina no se debía a una alteración en la expresión de ObR sino a alteraciones en su señalización (Mazzucco et al., 2016).

El cultivo de hígados fetales en presencia o ausencia de leptina evidenció una resistencia a las acciones lipolíticas de leptina en los hígados del grupo DGS, sugiriendo que la dieta materna rica en grasas saturadas induce anomalías en los mecanismos lipolíticos inducidos por leptina en el hígado fetal. Nos preguntamos si era la actividad de leptina o de PPAR $\alpha$  lo que estaba fallando y de acuerdo con los resultados y conclusiones obtenidas se plantearon los objetivos que conformaron este trabajo de tesina de grado.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis:

Los fetos y la descendencia adulta de rata alimentada con una dieta rica en grasas saturadas presentan sobreacumulación de lípidos y una expresión disminuida de los genes clave en el catabolismo de lípidos en el hígado. Dichos genes son inducibles por la activación de PPAR $\alpha$ . Dadas las observaciones mencionadas y la relevancia del receptor nuclear PPAR $\alpha$  como blanco del desarrollo de drogas para el tratamiento del hígado graso postulamos la siguiente hipótesis de trabajo: *“La alimentación materna con una dieta con exceso de grasas saturadas altera las vías del catabolismo de lípidos inducidos por PPAR $\alpha$  en el hígado fetal y programa la desensibilización de dichas vías en el hígado de la descendencia”*

### Objetivo:

Estudiar las alteraciones metabólicas inducidas por la sobreingesta materna de grasas saturadas sobre el hígado fetal y de la descendencia adulta en rata. En particular, se propone estudiar posibles alteraciones en la vía del catabolismo lipídico inducido por la activación de PPAR $\alpha$  en el hígado de los fetos y de la descendencia adulta de rata alimentada con una dieta enriquecida en grasas saturadas.

Los objetivos específicos consisten en:

- 1- Caracterizar los grupos de trabajo de hembras alimentadas con dieta estándar (CT) o enriquecida en grasas saturadas (DGS) en cuanto a la ganancia de peso materno previo y durante la gestación, los parámetros plasmáticos de lípidos y glucosa de la madre, los fetos y las crías de 140 días de edad, y el peso corporal y hepático de los fetos y de las crías de 140 días de edad.
- 2- Estudiar el efecto de la dieta materna con exceso de grasas saturadas sobre el hígado fetal y de las crías de 140 días de edad.

- a. Evaluar en el hígado de fetos provenientes del grupo CT y del grupo DGS, los niveles de ARN mensajero, niveles proteicos y localización de Plin2, involucrados en el metabolismo de lípidos, y los niveles de 4HNE como marcador de daño por estrés oxidativo.
  - b. Evaluar en el hígado de la descendencia adulta del grupo CT y del grupo DGS, los niveles de ARN mensajero, niveles proteicos y localización de Plin2, involucrados en el metabolismo de lípidos; los niveles de 4HNE como marcador de daño por estrés oxidativo, y los niveles de algunos marcadores de la enfermedad de hígado graso (FABP4, MnSOD y PPAR $\alpha$ ).
- 3- Estudiar el efecto del agonista de PPAR $\alpha$ , clofibrato, en el metabolismo de lípidos en los hígados fetales y de las crías de 140 días de edad, del grupo control (CT) y del grupo con exceso de grasas saturadas (DGS).
- a. Evaluar en cultivos de explantos hepáticos provenientes de fetos y crías de 140 de días del grupo CT y del grupo DGS, el efecto de la activación de PPAR $\alpha$  sobre los niveles de lípidos neutros (fosfolípidos, triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libre y ésteres de colesterol).
  - b. Evaluar en cultivos de explantos hepáticos provenientes de fetos y crías de 140 de días del grupo CT y del grupo DGS, los niveles de ARN mensajero de genes blanco de PPAR $\alpha$  que se encuentran involucrados en el metabolismo de los lípidos (ACO, CPT-1 y Plin2).

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Animales.

Para el desarrollo de este trabajo, se utilizaron ratas hembra albino Wistar que fueron adquiridas en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y mantenidas en el bioterio del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos con libre acceso al alimento balanceado (Asociación Cooperativa Argentina, Buenos Aires, Argentina) y al agua. Los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12 y 12 horas respectivamente, la temperatura de 24 °C y humedad constante. El cuidado y uso de los animales ha seguido las normas de la guía de la Institución local, basada en las pautas del National Institute of Health (NIH) especificadas en “Principles of Laboratory Animal Care, NIH publication N° 85-23, revised 1985”. El protocolo fue aprobado por el Comité Institucional Para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (CICUAL) bajo el número de resolución 2210.

#### 3.1.1 Modelo de sobrepeso materno: diseño experimental.

##### *Modelo de sobrepeso.*

Hace un tiempo, en el Laboratorio de Reproducción y Metabolismo se desarrolló un modelo de sobrepeso materno, para lo que se alimentaron ratas hembra Wistar con una dieta rica en grasas saturadas (Mazzucco et al., 2013). Para la realización de este trabajo, un grupo de 26 ratas de 6 semanas de edad fueron separadas en 2 grupos: 13 ratas formaron parte de un **grupo control (CT)**, alimentadas con una dieta comercial estándar con un contenido de 5% de lípidos; y las 13 ratas restantes formaron parte de un **grupo alimentado con una dieta rica en grasas saturadas (DGS)**, que consistió en la dieta comercial estándar suplementada con un 25% de grasas saturadas de origen animal, por el agregado de manteca derretida (Sancor Co., Buenos Aires, Argentina) al alimento. Ambos alimentos, el estándar y el alimento con el agregado de manteca, se enviaron a analizar al servicio de análisis de alimentos para el rotulado nutricional del INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial) y del INAL (Instituto Nacional de Alimentos). En la **Tabla 1** se muestra la composición

nutricional de las dos dietas y en la **Tabla 2** el porcentaje de calorías aportadas por cada componente dietario. Durante 8 semanas, las ratas de los grupos CT y DGS fueron alimentadas con la respectiva dieta, y luego se las colocó en apareo con machos control alimentados con dieta comercial estándar (CT). La observación de espermatozoides en el extendido vaginal determinó el día 1 de gestación. El 92% de las ratas se preñaron dentro de los diez días de apareo. Las ratas que no fueron preñadas dentro de los 20 días fueron excluidas del experimento. Los tratamientos dietarios continuaron a lo largo de la preñez.

	<b>Dieta Control (CT)</b>	<b>Dieta Grasas Saturadas (DGS)</b>
<b>Proteínas (g)</b>	22	20
<b>Carbohidratos (g)</b>	47	43
<b>Grasas (g)</b>	5	26
<b>Energía (Kcal)</b>	352	517

**Tabla 1:** Composición nutricional de los tratamientos dietarios cada 100 g de alimento.

	<b>Dieta Control (CT)</b>	<b>Dieta Grasas Saturadas (DGS)</b>
<b>Proteínas (% Kcal)</b>	28,1	17,4
<b>Carbohidratos (% Kcal)</b>	60,1	37,3
<b>Grasas (% Kcal)</b>	12,8	45,3
<b>Energía (Kcal/100g)</b>	352	517

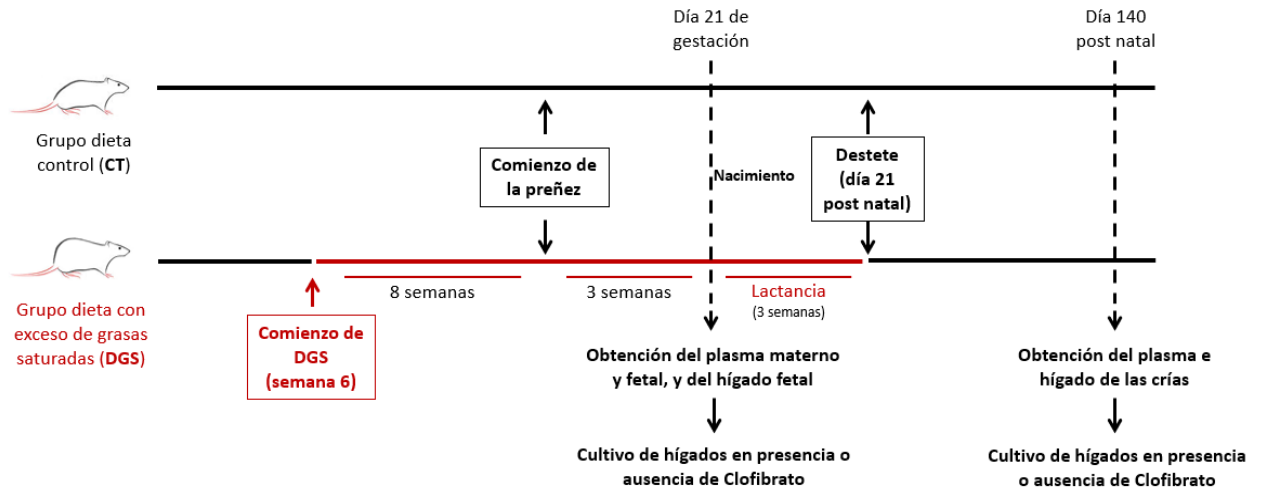
**Tabla 2:** Porcentaje de calorías sobre total de calorías.

### *Diseño experimental.*

Para los estudios de gestación a término, 6 ratas de cada uno de los grupos CT y DGS se sacrificaron en el día 21 de preñez para obtener el plasma materno y extraer los fetos (**Esquema 5**).

Para los estudios de programación intrauterina, 6 ratas de cada uno de los grupos CT y DGS parieron sus crías, que fueron ajustadas a un número final de 10 por camada,

preferentemente 5 hembras y 5 machos. En el día 21 post-natal las crías se separaron de sus madres y tanto las crías del grupo CT, como las del grupo DGS se alimentaron con dieta estándar hasta los 140 días de edad, momento que fueron sacrificadas para obtener el plasma y los hígados (**Esquema 5**).



**Esquema 5:** Modelo experimental para la obtención de plasma materno y fetal, e hígados fetales y de la descendencia adulta provenientes del grupo de ratas control (CT) y del grupo de ratas alimentado con exceso de grasas saturadas (DGS).

### 3.1.2 Estudio de los fetos a término de rata CT y DGS.

#### 3.1.2a Obtención del plasma materno y fetal, y de los hígados fetales.

Al día 21 de gestación, un día previo al parto, se sacrificaron 6 ratas tanto del grupo CT como del grupo DGS. Los animales fueron anestesiados en una cabina saturada de CO<sub>2</sub> y luego se les practicó la eutanasia por decapitación, y se colectó la sangre materna. Inmediatamente se realizó una incisión abdominal y se extrajo el útero para abrirlo y obtener los fetos. La sangre fetal también fue colectada por decapitación. La sangre materna y fetal fue centrifugada en tubos con heparina para la separación del plasma. Se guardó el plasma de todos los fetos hembra en un eppendorf y de los fetos macho en otro, preservándose a -80 ° C una muestra de plasma fetal de hembras y otra de machos por cada madre. Bajo una lupa y con la ayuda de pinza y tijeras especiales se determinó el sexo de cada feto y se removieron sus hígados. Por último, se procedió a guardarlos de la manera correspondiente de acuerdo a

la técnica a desarrollar: sumergidos durante 48 horas en formol y luego almacenados en etanol 70% para inmunohistoquímica; en solución fijadora de ARN, RNAlater®, a -80°C para los estudios de RT-qPCR; o se realizaron los cultivos con clofibrato como se explica a continuación. Se utilizó un n=6 para cada grupo dietario, correspondiente a un hígado de un feto hembra o macho de 6 madres distintas para cada una de las técnicas.

### **3.1.2b Estudio del efecto de la activación por PPAR $\alpha$ sobre el metabolismo de lípidos de hígados fetales CT y DGS.**

#### *Cultivos de explantos de hígado fetal.*

Se evaluó el efecto de la activación de PPAR $\alpha$  por clofibrato sobre el metabolismo de los lípidos. Para ello se incubaron los hígados fetales en presencia o no de Clofibrato (Sigma). Para definir la concentración mínima efectiva de trabajo se utilizaron distintas concentraciones de clofibrato. Para esto se cultivaron los explantos de hígados de fetos de 21 días de gestación de ratas del grupo CT en presencia de clofibrato 5 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 100 $\mu$ M o en medio Krebs sin adiciones. Una vez definida la concentración mínima efectiva (20 $\mu$ M), se evaluó la especificidad del clofibrato sobre la activación de PPAR $\alpha$  adicionando GW 6471 10 $\mu$ M, un antagonista selectivo de PPAR $\alpha$ , al cultivo. Se cultivaron entonces los hígados adicionando el clofibrato 20  $\mu$ M, adicionando el antagonista, adicionando ambos o sin adiciones. Todos los cultivos se realizaron en un baño térmico a 37°C durante 3 horas en atmósfera controlada.

Se procedió entonces a realizar los ensayos definitivos con la adición de clofibrato como agonista selectivo de PPAR $\alpha$  en la concentración mínima efectiva de 20 $\mu$ M. Se realizaron los cultivos con los hígados fetales de 21 días de gestación tanto del grupo CT como del grupo DGS con adición o no de clofibrato 20  $\mu$ M. Luego los hígados fetales fueron guardados a -80°C para los estudios de TLC o en solución RNA later® a -80°C para su estudio por RT-qPCR, hasta el momento de las determinaciones.



### 3.1.3 Estudio de la descendencia de rata CT y DGS.

#### 3.1.3a Obtención del plasma e hígado.

Con el objetivo de estudiar alteraciones metabólicas en la descendencia de rata programadas por el exceso de grasas saturadas en la dieta materna, se permitió nacer a las crías de un grupo de ratas del grupo CT y del grupo DGS. Los tratamientos dietarios maternos correspondientes continuaron hasta la finalización del período de lactancia (día 21 posnatal). Luego se alimentaron las crías de ambos grupos con dieta comercial estándar hasta los 140 días de edad, momento en el que se les practicó la eutanasia. Las crías fueron pesadas y luego de realizada la eutanasia se obtuvo el plasma e hígado, los cuales fueron fijados en formol por 48 horas y luego preservados en etanol 70% para estudios de inmunohistoquímica, guardados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para estudios de Western Blot, guardados en RNA later® a  $-80^{\circ}\text{C}$  para estudios de RT-qPCR o se cultivaron con clofibrato, como se explica a continuación, para su posterior análisis. Se utilizó un  $n=6$  para cada grupo dietario.

#### 3.1.3b Estudio del efecto de la activación por PPAR $\alpha$ sobre el metabolismo de lípidos en el hígado de la descendencia de rata CT y DGS

##### *Cultivo de explantos de los hígados de la descendencia.*

Se evaluó el efecto de la activación de PPAR $\alpha$  por clofibrato sobre el metabolismo de los lípidos en la descendencia adulta del grupo CT y DGS. Para ello se incubaron los hígados de las crías de 140 días de edad en presencia o no de Clofibrato (Sigma). Para definir la concentración mínima efectiva de trabajo se utilizaron distintas concentraciones de clofibrato. Para esto se cultivaron los explantos de hígados de la cría de 140 días de ratas del grupo CT en presencia de clofibrato  $5\mu\text{M}$ ,  $20\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$  o en medio Krebs sin adiciones. Una vez definida la concentración mínima efectiva ( $20\mu\text{M}$ ), se evaluó la especificidad del clofibrato sobre la activación de PPAR $\alpha$  adicionando GW 6471  $10\mu\text{M}$ , un antagonista selectivo de PPAR $\alpha$ , al cultivo. Se cultivaron entonces los hígados adicionando el clofibrato  $20\mu\text{M}$ , adicionando el antagonista, adicionando ambos o sin adiciones. Todos los cultivos se realizaron en un baño térmico a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas en atmósfera controlada.

Se procedió entonces a realizar los ensayos definitivos con la adición de clofibrato como agonista selectivo de PPAR $\alpha$  en la concentración mínima efectiva de 20 $\mu$ M. Se realizaron los cultivos con los hígados de las crías de 140 días tanto del grupo CT como del grupo DGS con adición o no de clofibrato 20  $\mu$ M. Luego los hígados fetales fueron guardados a -80°C para los estudios de TLC o en solución RNA later® a -80°C para su estudio por RT-qPCR, hasta el momento de las determinaciones.

### **3.2 Efecto de la activación de PPAR $\alpha$ sobre los niveles lipídicos en hígados fetales y de la descendencia.**

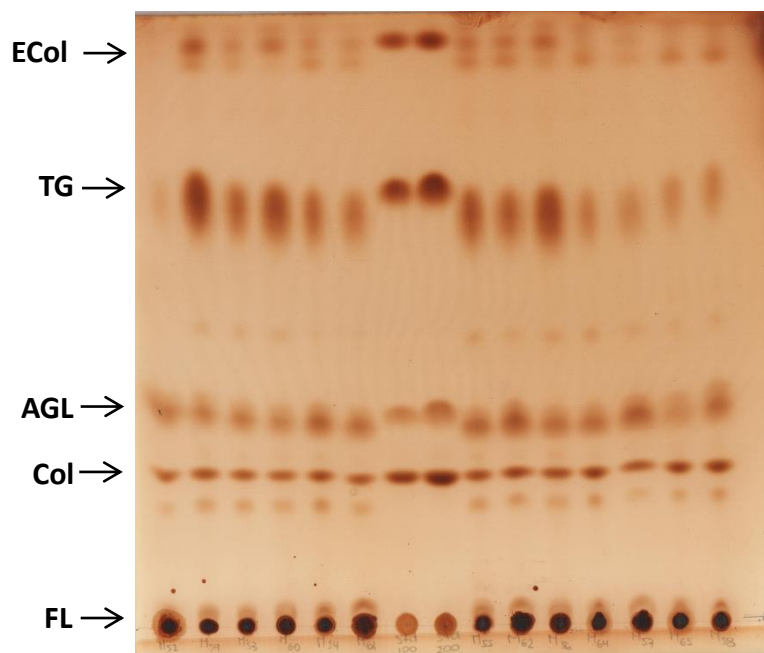
#### *Extracción lipídica.*

Con el fin de analizar los niveles lipídicos en el tejido hepático, se realizó la extracción de lípidos por el método Bligh-Dyer (Bligh and Dyer, 1959). Para esto se utilizaron los explantos de hígado fetal y de hígado de la descendencia de 140 días de edad de rata CT y DGS, cultivados en presencia o ausencia de clofibrato (20  $\mu$ M). De cada muestra se tomaron 100 mg de tejido y se homogeneizaron en 1 ml de PBS (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g/l, NaCl 7.75 g/l). Se tomaron 500  $\mu$ l del homogenato y se realizaron dos rondas de extracción orgánica con 3,5 ml de la solución Bligh-Dyer (Cloroformo 1: MeOH 2). Al volumen de la extracción se le agregó 1 ml de cloroformo y 1 ml de agua. Luego de la centrifugación se formaron dos fases: una superior acuosa (MeOH:H<sub>2</sub>O) y una inferior clorofórmica (CHCl<sub>3</sub>). Se descartó la fase superior y se evaporó al vacío la fase orgánica. Se reconstituyó el residuo con 1 ml de solución Bligh-Dyer. Se conservó a -20 °C para su posterior análisis.

#### *Cromatografía en capa delgada (TLC).*

Se tomó una alícuota de cada extracto de lípidos calculando una cantidad de proteína constante (método de Bradford, sección 4.3) y se evaporó a sequedad. Cada una fue reconstituida en 25  $\mu$ l de solución Bligh-Dyer y sembrada con un capilar en placas de TLC Sílica gel 60 (Merck), lavadas previamente con acetona. De la misma manera, junto con las muestras, se sembró una curva estándar de cantidades conocidas de las distintas especies lipídicas a analizar. Cada placa se desarrolló con una solución hexano: éter: ácido acético 80:20:2 para el desarrollo de lípidos neutros, se dejó secar y se reveló con vapores de yodo

para observar los niveles de las distintas especies lipídicas. El yodo se combina con las moléculas hidrofóbicas, evidenciando la presencia de los lípidos por la aparición de manchas marrones. En la placa se puede observar la movilidad de los lípidos según la polaridad, a menor polaridad, mayor movilidad (**Figura 4**). Luego las placas fueron digitalizadas y analizadas por densitometría con el programa Image J. Los valores obtenidos representan una relación de la intensidad y el área de las manchas. Estos valores se refirieron a la curva estándar de cada especie y los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de lípido/mg de proteína. Las especies lipídicas analizadas fueron fosfolípidos (FL), colesterol (Col), ácidos grasos libres (AGL), triglicéridos (TG) y ésteres de colesterol (ECol) (**Figura 4**).



**Figura 4:** Placa de sílica para TLC sembradas con muestras y estándares, observándose la movilidad de las distintas especies lipídicas según la polaridad.

### 3.3 Determinación de niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo de lípidos.

#### *Extracción de ARN.*

Para la extracción del ARN mensajero se utilizó el reactivo RNazol<sup>®</sup> RT (Molecular Research Center). Para esto, 100 mg del tejido se homogeneizaron (explantos de hígados sin

incubar y explantos de hígados incubados de fetos y de la descendencia de 140 días de edad, del grupo CT y DGS) en 1 ml de RNazol® RT. El homogenato fue separado en fase acuosa y orgánica por adición de 0,4 ml de H<sub>2</sub>O y posterior centrifugación, precipitando el ADN y las proteínas. El ARN permanece exclusivamente en el sobrenadante, por lo tanto, la fase orgánica fue descartada. Luego se precipitó el ARN por el agregado de 0,4 ml de etanol 75%, dejándolo a temperatura ambiente por 10 minutos y centrifugándolo. Se realizaron dos lavados con etanol 75% y finalmente se solubilizó en agua estéril libre de ARNasas. Se guardó a -80°C para su posterior análisis.

La concentración de ARN presente en cada muestra fue cuantificada mediante la técnica espectrofotométrica en NANODROP 1000 (Thermo Scientific), midiendo la absorbancia a 260 nm. La pureza de los extractos de ARN se determinó midiendo la relación de absorbancias 260/280 nm.

#### *Síntesis de ADN complementario.*

A partir del ARN se sintetizó el ADN complementario (cDNA) por el ensayo de transcriptasa reversa. Para esto se tomaron 4 $\mu$ g del ARN extraído y se colocó en una primera mezcla de reacción que contiene cebadores hexámeros al azar (Random Primers, Promega). Se colocó en un termociclador durante 5 minutos a 70°C para desarmar estructuras secundarias y permitir el acceso de los cebadores a las cadenas de ARN mensajero. Luego se le adiciona una segunda mezcla de reacción que contiene la enzima M-MLV (transcriptasa reversa, Promega), los dNTPs (Invitrogen) y el buffer comercial correspondiente a la enzima (Promega). En esta segunda etapa, se utilizó una temperatura de 37 °C durante 60 minutos para sintetizar el cDNA, seguida de 70°C por 15 minutos para inactivar la MMLV y linealizar el cDNA. El cDNA fue congelado a -20°C para su posterior análisis.

#### *Amplificación.*

Se realizó RT-qPCR de los genes involucrados en el metabolismo de lípidos, Acil-CoA oxidasa (ACO) y carnitina palmitoil transferasa I (CPT-1); y de la Perilipina 2 (Plin2), proteína involucrada en el tráfico interno de lípidos. Para esto, se utilizó como ADN molde el cDNA sintetizado anteriormente de todos los grupos en estudio. Una dilución del cDNA fue amplificada por PCR en tiempo real en una mezcla de reacción que contiene dNTPs

(Biocientífica), enzima GoTaq Polimerasa (Promega), el intercalante fluorescente Eva Green 20X (Biotium) y el par de cebadores específico (ThermoFisher). El seguimiento en tiempo real de la cuantificación por fluorescencia de los productos de amplificación se realizó en un Rotor Gene 6000 Corbette.

Las secuencias de cebadores específicos para los genes de interés fueron diseñadas con el Primer Blast, seguido de comprobar su eficiencia con OligoCalc. Para el diseño de los mismos, se seleccionó el par de tal manera que se amplificara una región del ARNm que abarque al menos una secuencia intrónica para no amplificar posibles contaminaciones con ADN genómico, entre otros criterios. En la **Tabla 3** se muestran las secuencias utilizadas, junto con la temperatura de melting óptima para cada uno, calculadas con la fórmula (1) por cebador y realizando un promedio por gen.

$$Tm = 4 \times (G + C) + 2 \times (T + A) \tag{1}$$

Gen/Cebador	Sentido (5'-3')	Anti-sentido (5'-3')	Tm
ACO	CCAATCACGCAATAGTTCTGG	CGCTGTATCGTATGGCGAT	60°C
CPT-1	AGGTCTGGCTCTACCACGAT	CGTGCAAAATAGGTCTGCCG	62°C
Plin2	CAAAAGGGCCAGGAGACCAT	GTATGTGACTCGATGTGCTCAG	64°C
L30	CCATCTTGGCGTCTGATCTT	TGGCGAGGATAACCAATTTC	59°C
B2 $\mu$ G	CCGTGATCTTTCTGGTGCTT	ATTTGAGGTGGGTGGAAGT	60°C

**Tabla 3:** Secuencias de cebadores utilizados para RT-qPCR, Tm: temperatura de melting óptima por gen.

La dilución de cDNA utilizada fue seleccionada mediante la realización de una curva de concentración de cDNA, que consistió en la amplificación de diluciones en serie del cDNA de interés. Se corroboró que la eficiencia de amplificación de la curva fuera de 1 $\pm$ 0,2 y se seleccionó un valor de dilución que se encuentre dentro del rango de eficiencia de todos los genes en estudio, dentro del rango lineal de amplificación. La concentración de cebadores y la temperatura de annealing y extensión se seleccionaron de manera que no se observara dímeros de cebadores. En la **Tabla 4** se observa el programa utilizado para todas las amplificaciones,

variando únicamente la temperatura de melting específica para cada gen, presentadas en la tabla anterior.

Programa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
<b> Holding </b>	95	5 minutos	1
<b> Cycling </b>	95	10 segundos	40
	Tm	15 segundos	
	72	20 segundos	

**Tabla 4:** Programa de amplificación utilizado para los ensayos de RT-qPCR.

La detección directa de los productos de PCR se monitoreó midiendo el incremento en la fluorescencia resultante de la unión del colorante al ADN doble cadena. Todas las muestras fueron testeadas contra dos genes de referencia, la proteína ribosomal L30, y la cadena liviana del complejo mayor de histocompatibilidad  $\beta$ 2-microglobulina. Ambos genes de referencia fueron usados como controles internos para la normalización de datos, procedimiento necesario para la corrección de las variaciones entre muestras en calidad y cantidad de cDNA. Se utilizó como control negativo la amplificación de la mezcla de reacción sin cDNA.

El análisis de los resultados se procesó en el programa Rotor Gene Q. La cuantificación de los niveles de ARN mensajero de los genes blanco fue realizada mediante un análisis por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . El método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  se utiliza para calcular los cambios relativos en la expresión génica determinada a partir de experimentos de RT-qPCR. De esta manera evaluaron los resultados como cantidad de copias de ARN mensajero del gen de interés con respecto al grupo control sin incubar o al grupo control sin adiciones (ambos relativizados a la media geométrica de los genes de referencia) (Livak and Schmittgen, 2001). El Ct (del inglés *cycle threshold*, cuya traducción es ciclo umbral) representa la intersección del valor del eje x (número de ciclos) con el umbral estipulado, de las curvas de amplificación que brinda el programa. Al utilizar dos genes de referencia, se calculó la media logarítmica entre las comparaciones del gen de interés y ambos genes de referencia. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia.

### 3.4 Determinación de proteínas.

La determinación de proteínas de las muestras fue realizada según la técnica descrita por Bradford (Bradford, 1976). En primer lugar, se realizó una prueba de la dilución de las muestras para definir la que entre en la curva de calibración, utilizando una mezcla de algunas muestras. Se tomó una alícuota de 10  $\mu$ l de tejido hepático homogeneizado correspondiente según la técnica y se realizó una dilución de 1:20 en solución salina. Se tomaron 5  $\mu$ l de la dilución y se mezclaron con 500  $\mu$ l de solución de reactivo de Bradford (en una concentración 1:5 en solución salina, Bio-Rad). La concentración proteica de la muestra se calculó mediante la comparación de la absorbancia obtenida con una curva de calibración realizada utilizando seroalbúmina bovina (BSA) en diferentes cantidades, como curva estándar. En tubos de vidrio se preparó la curva colocando las distintas cantidades de BSA (0  $\mu$ g, 2  $\mu$ g, 4  $\mu$ g, 6  $\mu$ g, 8  $\mu$ g, 10  $\mu$ g, 12  $\mu$ g, 14  $\mu$ g, 16  $\mu$ g, 18  $\mu$ g, 20  $\mu$ g) y se le agregó 500  $\mu$ l de reactivo de Bradford. Se colocó 200  $\mu$ l de cada tubo de reacción (con muestra y con de todos los puntos de la curva) en una placa de 96 wells. Cada muestra fue sembrada por duplicado para minimizar errores. Luego de 5 minutos se determinó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595nm.

### 3.5 Determinación de niveles proteicos mediante Western blot.

Se homogeneizó 200 mg de tejido (explantos de hígados tanto de los fetos como de la descendencia de rata CT y de rata DGS sin incubar) en 1 ml de buffer D (250 mM de sucrosa en 10 mM de buffer Hepes-Tris, agregando inhibidor de proteasas (1:200) e inhibidor de fosfatasas (1:200)) a 15000 rpm por 5 segundos, siempre en hielo. Se fraccionó el homogenato para su conservación a -80°C, separando una alícuota para la medición de la concentración de proteínas por el método de Bradford (Sección 4.4). Para la evaluación de los niveles de proteínas mediante la técnica de Western blot (Federici et al., 2001)(Federici et al., 2001)(Federici et al., 2001)(Federici et al., 2001)(Federici et al., 2001)(Federici et al., 2001)(Federici et al., 2001)se tomó de cada muestra una alícuota de volumen equivalente a 100  $\mu$ g de proteínas, y se diluyó en buffer muestra 4X (Trizma base 10 mM, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.06%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%). Antes de la



siembra, las muestras se llevaron a un baño térmico de 99°C durante 5 minutos con el objetivo de desnaturalizar las proteínas.

Se sembraron las muestras en un gel de poliacrilamida al 12% para separar las proteínas por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) en condiciones desnaturalizantes. La electroforesis se realizó en amperaje constante, a 60V durante 30 minutos y a 120V durante los siguientes 60 minutos. En una de las calles se sembró el marcador de peso molecular Rainbow (GE Healthcare). Al finalizar la electroforesis, los geles fueron lavados en buffer de transferencia (Trizma base 20 mM, glicina 150 mM, metanol 20%, pH 8.8), con el objeto de eliminar el SDS remanente. Se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 $\mu$ m (Trans-Blot Turbo Mini Nitrocellulose Transfer Membrane, BioRad).

Para corroborar la eficiencia de la carga y de la transferencia, las membranas fueron coloreadas con Rojo Ponceau. Luego las membranas fueron bloqueadas durante 60 minutos con solución de bloqueo (1% de BSA en TBS: Trizma base 25 mM, NaCl 136.7 mM, KCl 2.68 mM, pH 7.4) y posteriormente incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 5**) durante 24 horas en cámara fría a 4°C y en agitación. Tras realizar tres lavados con TBS-Tween para eliminar el anticuerpo que no se unió específicamente, se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 5**). Nuevamente se realizaron los lavados y se procedió a detectar la señal de quimioluminiscencia al agregar el kit comercial Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). Las membranas fueron reveladas en un equipo diseñado para la adquisición de imágenes de quimioluminiscencia, GeneGnome XRQ (Syngene). Se realizó un control negativo incubando una calle únicamente con el anticuerpo secundario, omitiendo el anticuerpo primario.

Mediante este ensayo se midió la expresión de proteínas con un rol protagónico en la protección o desarrollo de la enfermedad de hígado graso, comparando la descendencia adulta del grupo CT con la descendencia adulta proveniente del grupo DGS. A continuación, en la **Tabla 5** se muestran los anticuerpos primarios y secundarios de las proteínas de interés.



<b>Anticuerpo primario (peso molecular)</b>	<b>Dilución</b>	<b>Tipo/Especie en donde se desarrollo</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Dilución</b>
<b>Anti-PPAR<math>\alpha</math> (57 KDa) (Cayman)</b>	1:1000	Policlonal/conejo	Contra conejo (Jackson)	1:5000
<b>Anti-FABP4 (15 KDa) (GeneTex)</b>	1:500	Policlonal/conejo	Contra conejo (Jackson)	1:5000
<b>Anti-Plin2 (48 KDa) (LifeSpan BioSciences)</b>	1:250	Monoclonal/ratón	Contra ratón (Jackson)	1:10000
<b>Anti-MnSOD (25 KDa) (Calbiochem)</b>	1:1000	Policlonal/oveja	Contra oveja (Santa Cruz)	1:2000
<b>Anti-Actina (42 KDa) (Sigma)</b>	1:500	Policlonal/conejo	Contra conejo (Jackson)	1:5000

**Tabla 5:** Anticuerpos utilizados para los ensayos de Western Blot.

En los casos en los que la misma membrana se utilizó para determinar dos proteínas diferentes, como es el caso de la actina, la membrana fue sometida a remoción del anticuerpo primario mediante un “Harsh Stripping”. El buffer se prepara con 20 ml de dodecilsulfato sódico 10% (SDS 10%), 12.5 ml de Tris HCl pH 6.8 0.5M, 67.5 ml de agua bidestilada y 0.8 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se incubaron con el buffer por 1 hora a 50°C y luego lavar tres veces durante 10 minutos con TBS-Tween a temperatura ambiente. Luego de este proceso la membrana fue incubada con solución de bloqueo durante 60 minutos y con el anticuerpo primario de la segunda proteína a detectar.

La intensidad de las bandas fue analizada empleando el programa Image J, teniendo en cuenta tanto la superficie como a la intensidad de las mismas, expresándose en unidades densitométricas arbitrarias relativas al control, luego de normalizarlo según el valor densitométrico correspondiente a la actina.

### 3.6 Inmunohistoquímica.

Los explantos hepáticos fueron fijados en formaldehído (4% en PBS) durante 48 horas y luego conservados en alcohol 70%. Se realizaron pasajes de alcoholes y benceno para deshidratar y preparar el tejido a incluir. Posteriormente se sumergieron en parafina los explantos deshidratados y se incubaron toda la noche a 56°C. Una vez incluido el tejido, se armaron los cubos de parafina con el tejido y se realizaron cortes de 5 $\mu$ m de espesor con un micrótomo y se los colocó sobre un portaobjetos. Los cortes obtenidos a partir del procedimiento histológico fueron utilizados para realizar ensayos de inmunohistoquímica.

En primer lugar, se realizaron dos lavados con xilol para desparafinar los cortes, seguido de la hidratación de los mismos con pasajes de etanol en graduaciones decrecientes: 100%, 90%, 80% y 70%, y por último con agua destilada. Una vez finalizada la hidratación, se inhibió la peroxidasa endógena con una solución 0.3% de peróxido de hidrógeno en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavaron los portaobjetos con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en PBS-tween (0.05%)-BSA (1%) en cámara húmeda durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego de ese período se lavó con PBS el anticuerpo primario excedente y se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado (Vector) durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios fueron utilizados en una dilución 1:200 en suero normal del animal en el que se sintetizó el secundario diluido 1:66 en PBS-tween. Luego de los lavados se agregó el complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC, Vectro) diluido 1:100 en PBS, y se incubó durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. A continuación, se lavó y reveló la presencia del antígeno mediante el agregado del sustrato de la peroxidasa (peróxido de hidrógeno 0,01%) y diaminobencidina (DAB: 0.04% en Tris 0.05 M pH 7,4). La enzima peroxidasa cataliza la oxidación de DAB obteniendo un precipitado color marrón en el lugar de la inmunomarcación. Luego de 10 minutos de reacción, ésta fue detenida con agua destilada. Se procedió a teñir con Hematoxilina durante 2 minutos y se permitió el viraje del color en agua corriente durante 10 minutos. El control negativo consistió en procesar los cortes de igual forma, pero incubando con PBS-Tween-BSA sin el anticuerpo primario. Finalmente se deshidrataron los cortes sometidos a pasajes de 10 minutos: 1 de etanol 70

%, 1 de etanol 80%, 1 de etanol 90%, 2 de etanol 100%, y 3 veces xilol 100%. Se colocó fijador Bálsamo de Canadá sobre el corte y se cubrió con un cubreobjetos.

Se detallan los anticuerpos primarios utilizados (**Tabla 6**) y los anticuerpos secundarios (**Tabla 7**).

Anticuerpo primario	Tipo/especie en donde se desarrolla	Dilución en hígado fetal	Dilución en hígado 140 días
Anti-4HNE (Abcam)	Policlonal/conejo	1:400	1:900
Anti-Plin2 (LifeSpan BioSciences)	Monoclonal/ratón	1:50	1:100

**Tabla 6:** Anticuerpos primarios utilizados para los ensayos de Inmunohistoquímica.

Anticuerpo secundario	Especie en donde se desarrolló
Anti IgG de conejo biotilado (Vector)	Cabra
Anti IgG de ratón biotilado (Vector)	Caballo

**Tabla 7:** Anticuerpos secundarios utilizados para los ensayos de Inmunohistoquímica.

Para el análisis de las muestras, se tomaron imágenes en un microscopio óptico Nikon, equipado con una cámara de captura directa de imagen conectada al programa Canon Remote Capture y la densidad óptica de la marca fue analizada con el programa ImageProPlus 4. De cada corte se tomaron imágenes de tres campos al azar, y de cada campo se evaluó la densidad óptica tomando una misma área 8 veces al azar sobre la imagen. Se realizó un promedio por campo y luego por corte para realizar el análisis estadístico.

### 3.7 Análisis estadístico.

Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar. Se comprobó la normalidad de los datos antes de realizar el análisis estadístico mediante el test de Shapiro-Wilk (software

Infostat). Los grupos se compararon mediante el test t-Student, ANOVA de un factor y post test de Tukey o ANOVA de dos factores y post test Bonferroni (software GraphPad Prism 5). En todos los casos, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando P-valor < 0,05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterización del modelo dietario.

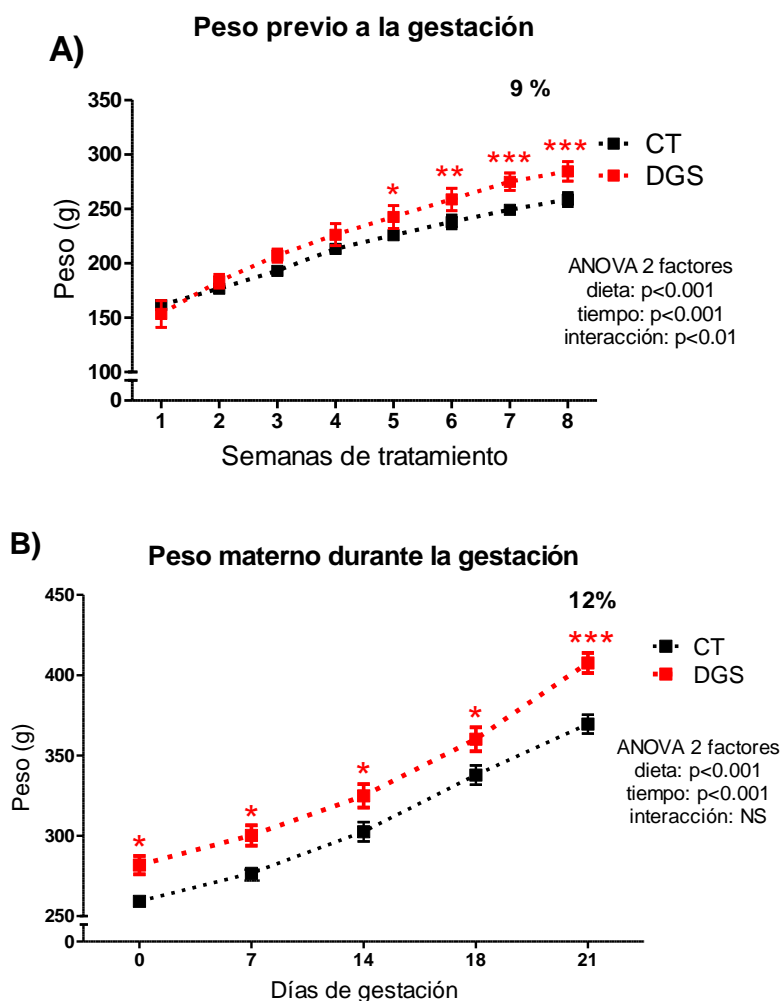
Se utilizó el modelo de sobrepeso descrito en metodología, y ya utilizado en el laboratorio (Mazzucco et al., 2016, Mazzucco et al., 2013). En una primera etapa se caracterizó el grupo de trabajo en cuanto al crecimiento, parámetros reproductivos y metabólicos. Se utilizaron ratas hembras Wistar con las cuales se formaron dos grupos que recibieron un tratamiento dietario diferencial cada uno. Las ratas que formaron parte del grupo control (CT) recibieron una dieta con alimento comercial estándar a lo largo de toda su vida. Las otras que formaron parte del grupo de dieta con un exceso de grasas saturadas (DGS) fueron alimentadas con el mismo alimento comercial estándar pero suplementado con un 25% de grasas saturadas de origen animal, suministrado por el agregado de manteca al alimento al igual que se realizó previamente (Mazzucco et al., 2013, Mazzucco et al., 2016).

La dieta comenzó a suministrarse a las seis semanas de edad y continuó durante ocho semanas, al cabo de las cuales las ratas fueron puestas en apareo con machos controles. El tratamiento dietario se continuó a lo largo de la gestación hasta el día 21 de la misma (día previo al parto), momento en el cual se realizó la eutanasia de los animales y se obtuvieron las muestras biológicas necesarias para los ensayos. Además, se permitió que un grupo de madres del grupo CT y del grupo DGS parieran a sus crías. Durante la lactancia se continuó administrando las dietas correspondientes, y el día del destete, correspondiente al día 21 posnatal, todas las crías fueron separadas de sus madres y alimentadas con dieta control. Se realizó la eutanasia el día 140 post natal de las crías de ambos grupos dietarios y se obtuvieron las muestras biológicas necesarias para los ensayos (**Esquema 5, pág. 29**). Se descartaron las hembras que no se preñaron en el término de 20 días.

### 4.2 Efectos de la dieta materna rica en grasas saturadas sobre el metabolismo materno y fetal.

#### 4.2.1 Efecto de la dieta materna rica en grasas saturadas sobre el peso y parámetros metabólicos en las madres y fetos al día 21 de gestación.

A partir de la semana 6 de vida, momento en el cual se comenzó el tratamiento dietario, se registraron los pesos corporales de las ratas tanto del grupo CT como del grupo DGS previo a la preñez y durante la gestación. En la semana 11 de vida, las ratas del grupo DGS presentaron mayor peso corporal respecto de las controles. Las siguientes semanas fueron incrementando su peso y a las 8 semanas de dieta las ratas del grupo DGS presentaban un 9% de aumento en el peso corporal respecto de las controles ( $p < 0,001$ ) (**Figura 5A**). Esta diferencia se mantuvo a lo largo de los 21 días de gestación ( $p < 0,05$ ) acentuándose en el último día de este período, momento en el cual las ratas del grupo DGS presentaron un 12% de aumento en el peso corporal respecto de las controles ( $p < 0,001$ ) (**Figura 5B**).



**Figura 5:** Peso materno A) previo y B) durante la gestación en ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con un exceso de grasas saturadas (DGS). \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  con respecto al control.  $n = 12$ . Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Luego de realizar la eutanasia de las ratas de ambos grupos al día 21 de gestación, se removieron los fetos y se registró el peso de los fetos y de los hígados fetales. En el grupo DGS se observó un mayor peso fetal respecto del grupo control ( $p < 0,01$ ), pero no hubo diferencias en el peso de los hígados fetales al comparar los grupos (**Tabla 8**). También se registró el número de fetos por camada, siendo mayor en el grupo DGS respecto del control ( $p < 0,05$ ) (**Tabla 8**). No hubo diferencias sexo-dependientes en relación al peso fetal, al peso de los hígados ni al número de fetos.

		Control	DGS	
<b>Peso fetal (g)</b>	Hembra	3.40 $\pm$ 0.08	3.92 $\pm$ 0.10 **	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,001 Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	3.22 $\pm$ 0.10	3.73 $\pm$ 0.11 **	
<b>Número de fetos</b>	Hembra	6.0 $\pm$ 0.5	8.0 $\pm$ 0.5 *	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,001 Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	5.0 $\pm$ 0.5	7.0 $\pm$ 0.6 *	
<b>Peso hígado fetal (mg)</b>	Hembra	310 $\pm$ 11	312 $\pm$ 12	ANOVA 2x2 Dieta: NS Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	314 $\pm$ 8	320 $\pm$ 14	

**Tabla 8:** Peso fetal, número de fetos por camada y peso del hígado fetal en el grupo de ratas control (CT) y en el grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  con respecto al control. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

Tal como previamente, se analizaron algunos parámetros metabólicos plasmáticos en el modelo en estudio (Mazzucco et al., 2013). Se dosaron los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en el plasma materno y fetal. Encontramos un incremento de la trigliceridemia materna ( $p < 0,01$ ) y fetal ( $p < 0,001$ ) en el grupo DGS respecto del grupo CT (**Tablas 9 y 10**). No evidenciamos cambios en los niveles de glucemia y colesterolemia de las madres del grupo DGS respecto del CT (**Tabla 9**), sin embargo, encontramos mayores niveles de glucemia y colesterolemia en fetos hembra y macho del grupo DGS y de colesterol en fetos macho del grupo DGS al realizar la comparación con los fetos del grupo CT ( $p < 0,05$ ) (**Tabla 10**).

	<b>Control</b>	<b>DGS</b>
<b>Glucemia Materna (mg/dL)</b>	83.2 $\pm$ 2.5	86.5 $\pm$ 1.9
<b>Trigliceridemia Materna (g/L)</b>	2.4 $\pm$ 0.21	4.11 $\pm$ 0.46 **
<b>Colesterolemia Materna (g/L)</b>	1.19 $\pm$ 0.10	1.20 $\pm$ 0.08

**Tabla 9:** Niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos y colesterol en madres del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) en el día 21 de gestación. Diferencia estadística entre grupo CT y DGS: \*\* p<0,01 con respecto al control. n=6. Test estadístico: t-Student.

		<b>Control</b>	<b>DGS</b>	
<b>Glucemia Fetal (mg/dL)</b>	Hembra	46.21 $\pm$ 3.90	63.73 $\pm$ 5.40 *	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,001 Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	41.93 $\pm$ 3.05	58.56 $\pm$ 4.10 *	
<b>Trigliceridemia Fetal (g/L)</b>	Hembra	0.53 $\pm$ 0.06	0.98 $\pm$ 0.06 ***	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,001 Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	0.51 $\pm$ 0.07	0.96 $\pm$ 0.05 ***	
<b>Colesterolemia Fetal (g/L)</b>	Hembra	0.63 $\pm$ 0.06	0.84 $\pm$ 0.05 *	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,001 Sexo: NS Interacción: NS
	Macho	0.66 $\pm$ 0.06	0.87 $\pm$ 0.06 *	

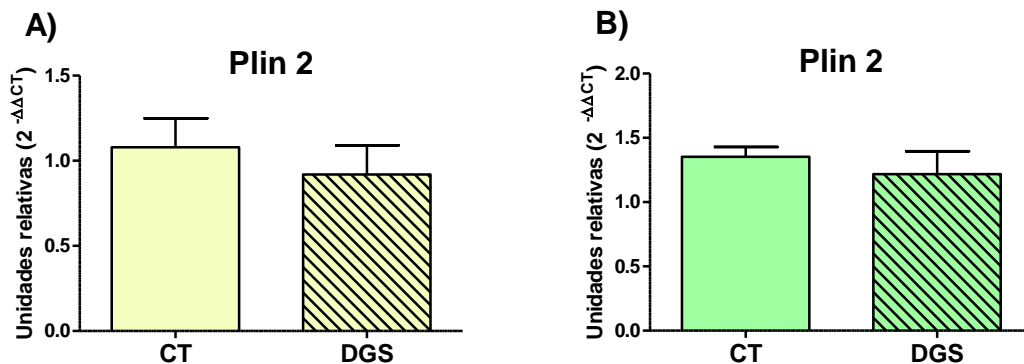
**Tabla 10:** Niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos y colesterol en fetos del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS) en el día 21 de gestación. Diferencia estadística entre grupo CT y DGS: \*p<0,05 \*\*\*p<0,001 con respecto al control. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.



#### 4.2.2 Efecto de la dieta materna rica en grasas saturadas sobre el metabolismo del hígado de fetos al día 21 de gestación.

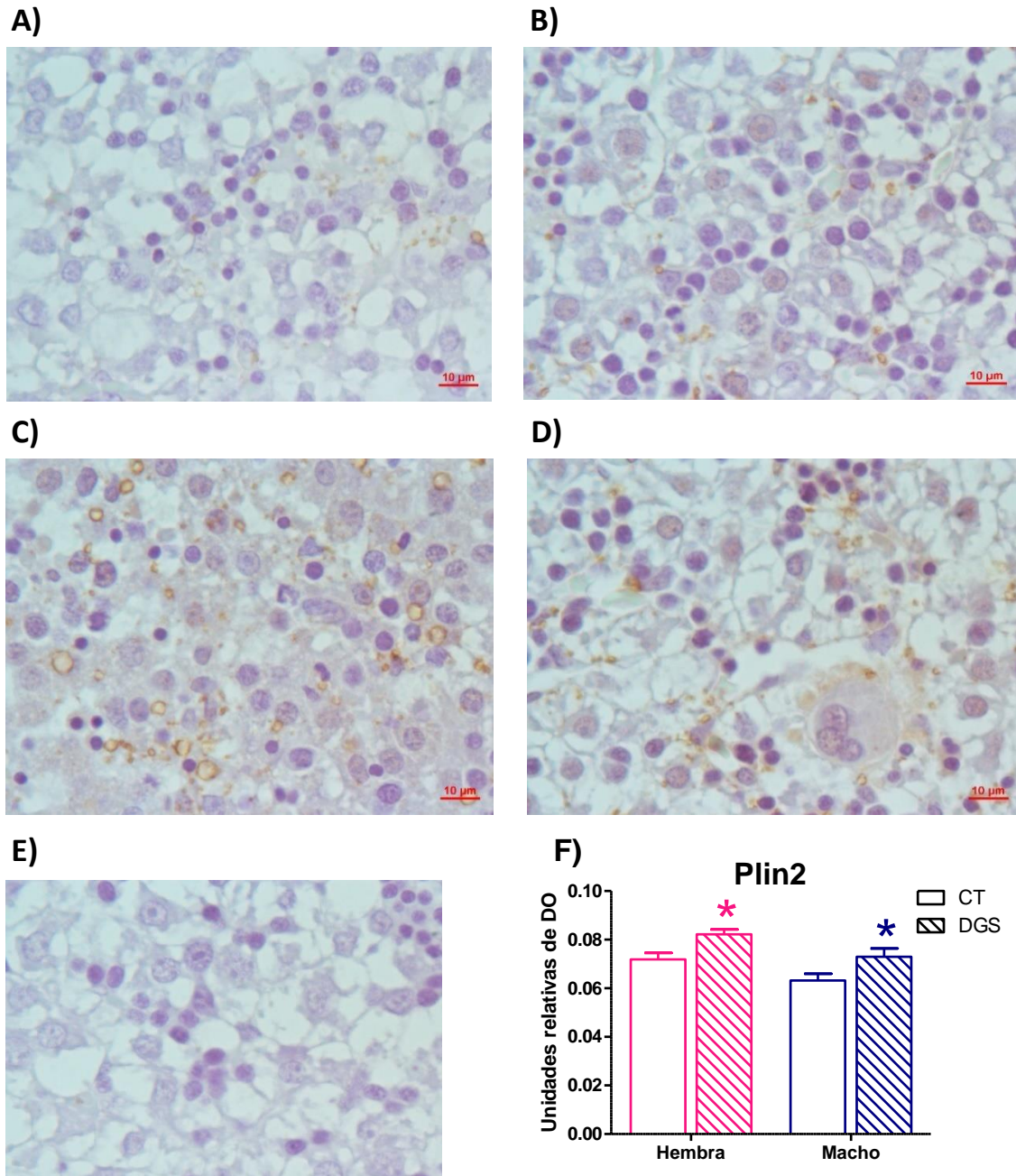
##### 4.2.2a Expresión y localización de Plin2 en el hígado fetal de las ratas CT y DGS.

Anteriormente en nuestro laboratorio se observó una acumulación de triglicéridos en los hígados fetales al día 21 de gestación del grupo DGS respecto del CT. Nos interesó evaluar los niveles de ARN mensajero y de la proteína Plin2, que forma parte de la superficie de las gotas lipídicas involucrada en el tráfico interno de lípidos y que se encuentra incrementada en patologías caracterizadas por hígado graso (Guilherme et al., 2008). No encontramos diferencias en los niveles de ARN mensajero de Plin2 en el grupo DGS ni en hembras (**Figura 6A**) ni en machos (**Figura 6B**) respecto del grupo control.



**Figura 6:** Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de Plin2 relativos a la media geométrica de los genes de referencia L30 y  $\beta 2\mu G$  en hígados de fetos A) hembras y B) machos de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). n=6. Test estadístico: T-Student.

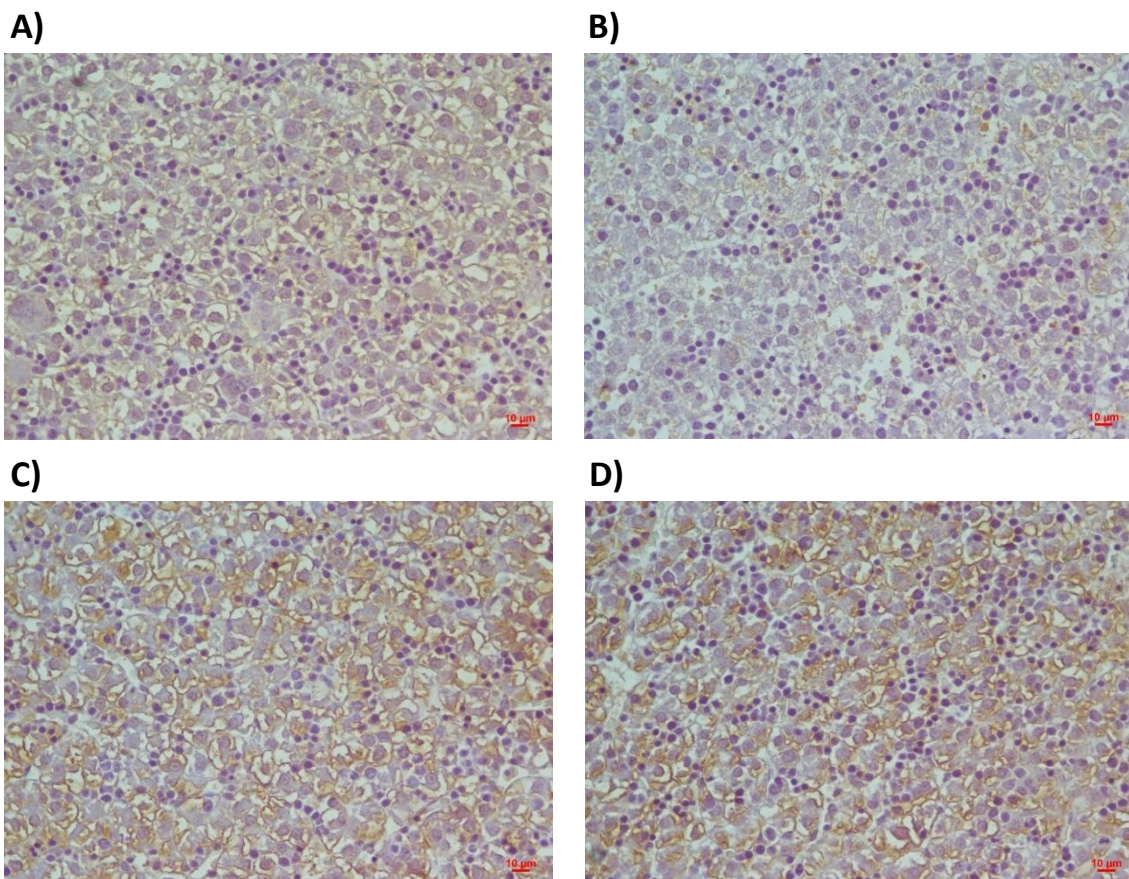
En relación a los niveles y localización de proteína, evaluamos Plin2 por inmunohistoquímica. Observamos la disposición circular de Plin2 denotando su ubicación periférica a las gotas lipídicas distribuidas de manera uniforme en todo el hígado fetal. El análisis mostró mayores niveles de Plin2 en los hígados de los fetos hembra y macho provenientes de ratas del grupo DGS al compararlo con el grupo control ( $p < 0,05$ ) (**Figura 7**), sin encontrar diferencias sexo-dependientes.



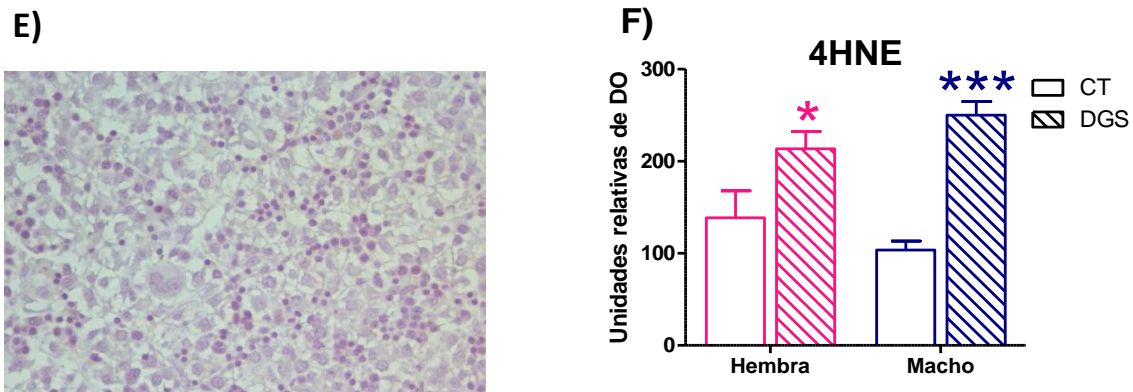
**Figura 7:** Niveles proteicos de Plin2 evaluados por inmunohistoquímica. Fotos representativas de hígados de fetos de 21 días de gestación A) hembra y B) macho proveniente del grupo control (CT), y C) hembra y D) macho proveniente del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS), E) control negativo. Aumento: 1000X. F) Cuantificación densitométrica. \* $p < 0,05$  con respecto al control.  $n = 6$ . Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni. Dieta:  $P < 0,01$  Sexo:  $P < 0,01$  Interacción: NS

#### 4.2.2b Niveles de 4HNE en el hígado fetal de ratas CT y DGS.

Analizamos los niveles de 4-hidroxi-nonenal (4HNE), un producto aldehído de la peroxidación lipídica e indicador de daño por estrés oxidativo. Observamos un aumento de los niveles de 4HNE en los hígados fetales de hembras ( $p < 0,05$ ) y machos ( $p < 0,001$ ) provenientes del grupo DGS respecto del control, evaluados por inmunohistoquímica (**Figura 8**), sin encontrar diferencias sexo-dependientes.







**Figura 8:** Niveles de 4HNE evaluados por inmunohistoquímica. Fotos representativas de hígados de fetos de 21 días de gestación A) hembra y B) macho proveniente del grupo control (CT), y C) hembra y D) macho proveniente del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS), E) control negativo. Aumento: 400X. F) Cuantificación densitométrica. \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$  con respecto al control.  $n = 6$ . Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni. Dieta:  $P < 0,001$  Sexo: NS Interacción: NS

### 4.3 Efecto de la dieta materna rica en grasas saturadas sobre el metabolismo de la cría de 140 días de edad.

#### 4.3.1 Efecto de la dieta materna rica en grasas saturadas en el peso corporal, el peso del hígado y parámetros metabólicos en las crías de 140 días de edad.

Al evaluar los parámetros plasmáticos en las crías de 140 días de edad, no encontramos diferencias en los valores de glucemia, trigliceridemia y colesterolemia en el grupo DGS respecto al grupo control. Tampoco observamos cambios en el peso corporal y hepático debido a la dieta materna. Tanto en el grupo control como en el grupo DGS observamos un mayor peso corporal y hepático en machos respecto a las hembras ( $p < 0,001$ ) (Tabla 11).

		<b>Control</b>	<b>DGS</b>	
<b>Glucemia</b> (mg/dL)	Macho	100 $\pm$ 4	93 $\pm$ 3	ANOVA 2x2 Dieta: NS Sexo: NS Interacción: NS
	Hembra	100 $\pm$ 3	104 $\pm$ 6	
<b>Trigliceridemia</b> (mg/dL)	Macho	128 $\pm$ 9	125 $\pm$ 12	ANOVA 2x2 Dieta: NS Sexo: NS Interacción: NS
	Hembra	113 $\pm$ 9	109 $\pm$ 9	
<b>Colesterolemia</b> (g/dL)	Macho	93 $\pm$ 3	85 $\pm$ 5	ANOVA 2x2 Dieta: NS Sexo: NS Interacción: NS
	Hembra	91 $\pm$ 7	80 $\pm$ 6	
<b>Peso corporal</b> (gr.)	Macho	555 $\pm$ 19	606 $\pm$ 19	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,05 Sexo: P<0,001 Interacción: NS
	Hembra	327 $\pm$ 11 <sup>###</sup>	352 $\pm$ 12 <sup>###</sup>	
<b>Peso del hígado</b> (gr.)	Macho	15.64 $\pm$ 0.43	16.39 $\pm$ 0.61	ANOVA 2x2 Dieta: P<0,05 Sexo: P<0,001 Interacción: NS
	Hembra	10.14 $\pm$ 0.15 <sup>###</sup>	11.22 $\pm$ 0.29 <sup>###</sup>	

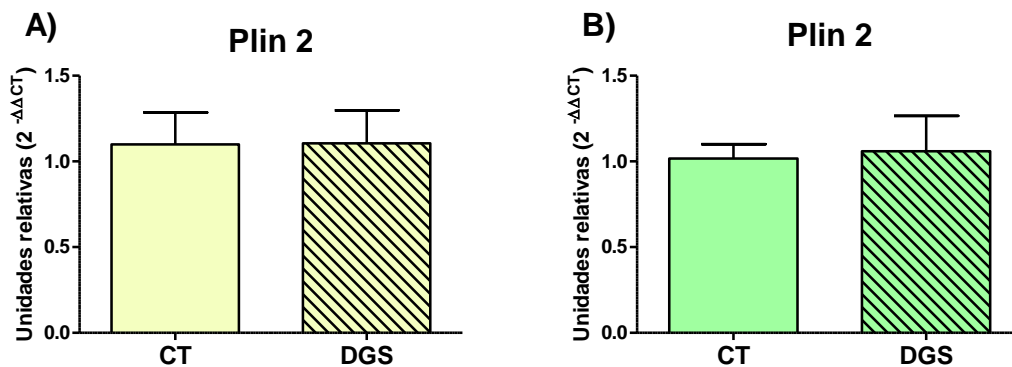
**Tabla 11:** Niveles plasmáticos de glucemia, trigliceridemia, colesterolemia, y peso corporal y hepático de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). <sup>###</sup>p<0,001 al comparar hembra vs macho dentro del mismo grupo dietario. n=6. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

### 4.3.2 Efecto de la dieta materna rica en grasas saturadas sobre el metabolismo del hígado de crías de 140 días de edad.

#### 4.3.2a Niveles y expresión de Plin2 en el hígado de crías de 140 días de ratas CT y DGS.

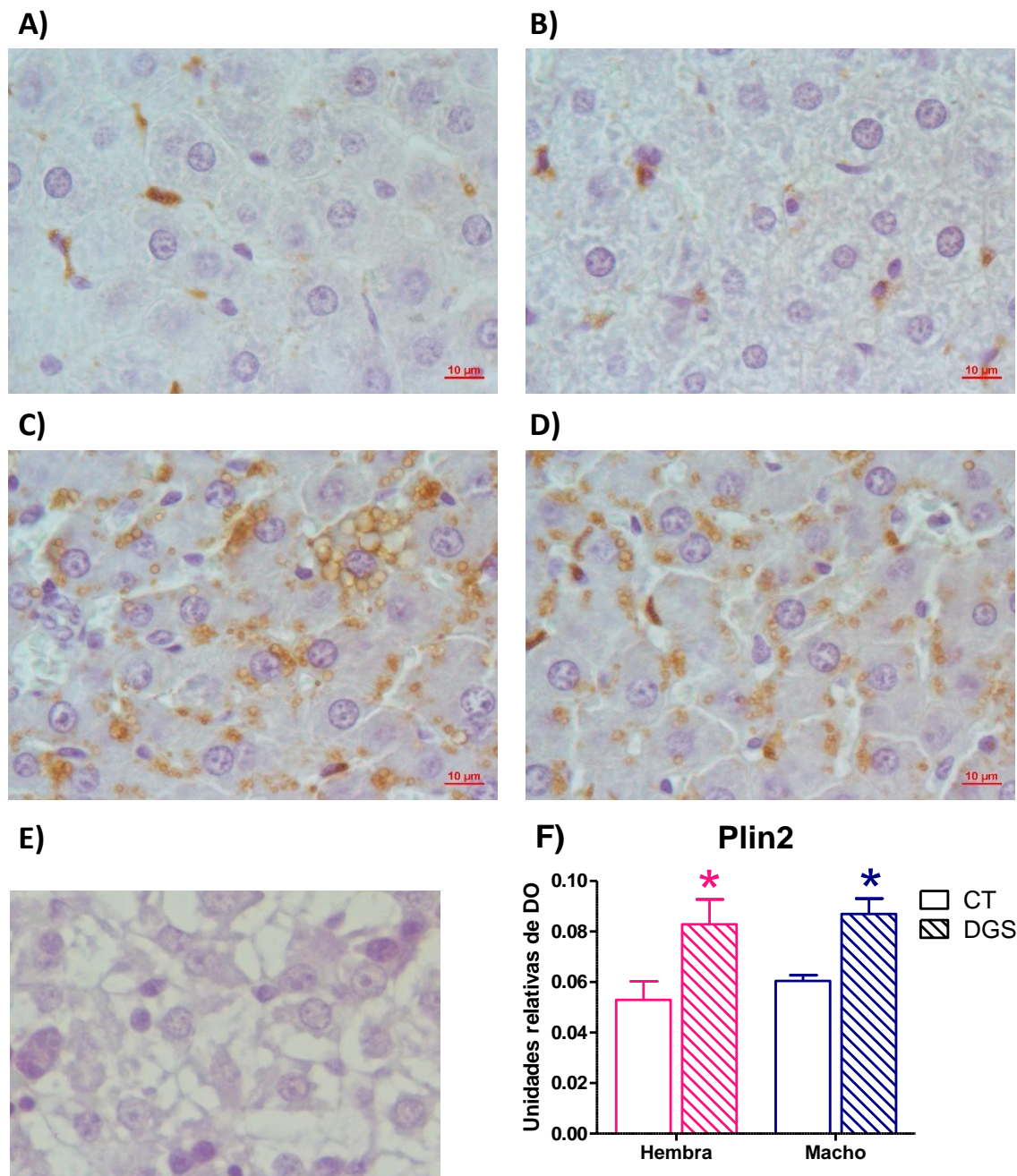
La sobreacumulación de triglicéridos en los hígados de las crías de 140 días de edad del grupo DGS respecto del control, tal como fue detallada en “Antecedentes”, junto con las alteraciones en los niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el catabolismo de lípidos como ACO y CPT-1, y la relevancia de Plin2 en el reservorio lipídico y el transporte interno de los mismos, nos llevó a evaluar los niveles de su mensajero. Al analizar los niveles

de ARN mensajero de Plin2, no encontramos diferencias en los hígados de las crías de 140 días de edad del grupo DGS respecto del control, ni en hembras (**Figura 9A**) ni en machos (**Figura 9B**).



**Figura 9:** Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de Plin2 relativos a la media geométrica de los genes de referencia L30 y  $\beta 2\mu G$  en hígados de crías de 140 días de edad A) hembras y B) machos provenientes de ratas del grupo control (CT) y del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). n=6. Test estadístico: T-Student.

Sin embargo, al evaluar los niveles proteicos de Plin2 por inmunohistoquímica, encontramos un aumento en hígados hembra y macho de crías de 140 días de edad del grupo DGS con respecto del grupo CT ( $p < 0,05$ ) (**Figura 10**), sin encontrar diferencias sexo-dependientes. Al igual que en fetos, se observa la distribución de forma circular rodeando la gota lipídica sin observarse un patrón singular respecto de la localización celular o con respecto a la estructura hepática.



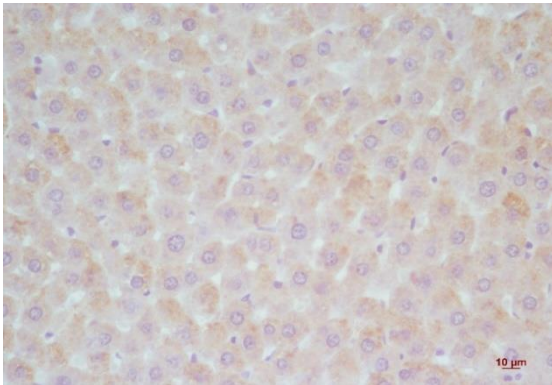
**Figura 10:** Niveles proteicos de Plin2 evaluados por inmunohistoquímica. Fotos representativas de hígados de crías de 140 días de edad A) hembra y B) macho proveniente del grupo control (CT), y C) hembra y D) macho proveniente del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS), E) control negativo. Aumento: 1000X. F) Cuantificación densitométrica. \* $p < 0,05$  con respecto al control.  $n = 6$ . Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni. Dieta:  $P < 0,001$  Sexo: NS Interacción: NS



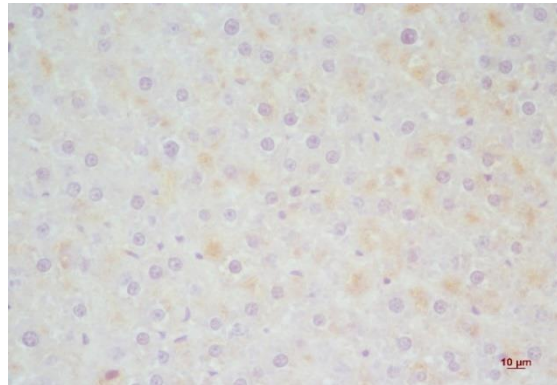
#### 4.3.2b Niveles de 4HNE en el hígado de crías de 140 días de ratas CT y DGS.

Como en los hígados de las crías de 140 días de edad, al igual que en los hígados fetales, se había observado previamente parámetros indicadores de estrés oxidativo y nitrativo en el grupo DGS respecto del control (Mazzucco, 2016), se evaluaron los niveles del producto de la peroxidación lipídica, 4HNE. Encontramos un incremento de los niveles de 4HNE en las crías de 140 días de edad del grupo DGS, tanto en crías hembras ( $p < 0,05$ ) como machos ( $p < 0,01$ ), con respecto al grupo CT (**Figura 11**), sin encontrar diferencias sexo-dependientes.

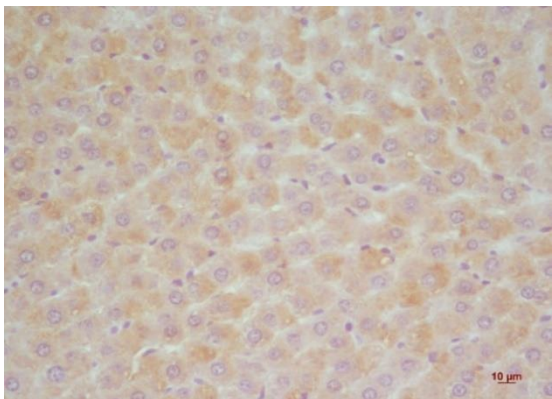
A)



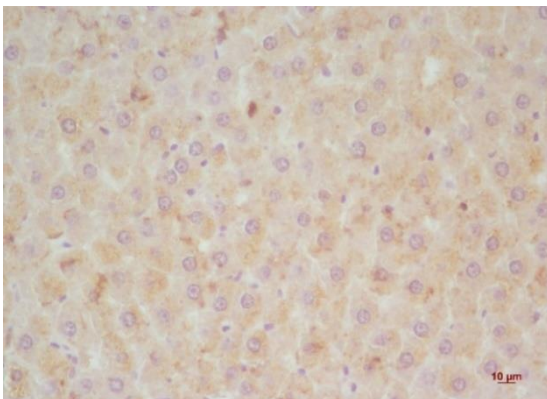
B)



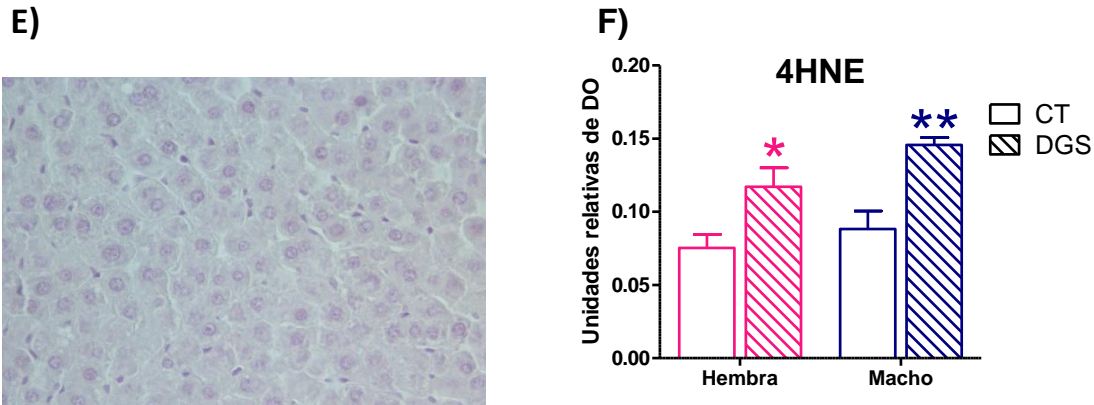
C)



D)



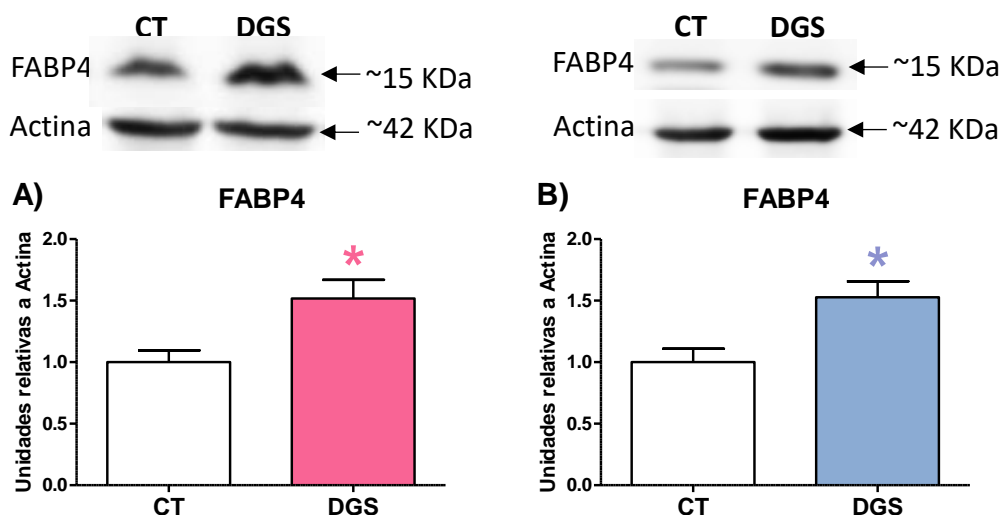




**Figura 11:** Niveles de 4HNE evaluados por inmunohistoquímica. Fotos representativas de hígados de crías de 140 días de edad A) hembra y B) macho proveniente del grupo control (CT), y C) hembra y D) macho proveniente del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS), E) control negativo. Aumento: 400X. F) Cuantificación densitométrica. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  con respecto al control.  $n = 6$ . Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni. Dieta:  $P < 0,001$  Sexo: NS Interacción: NS

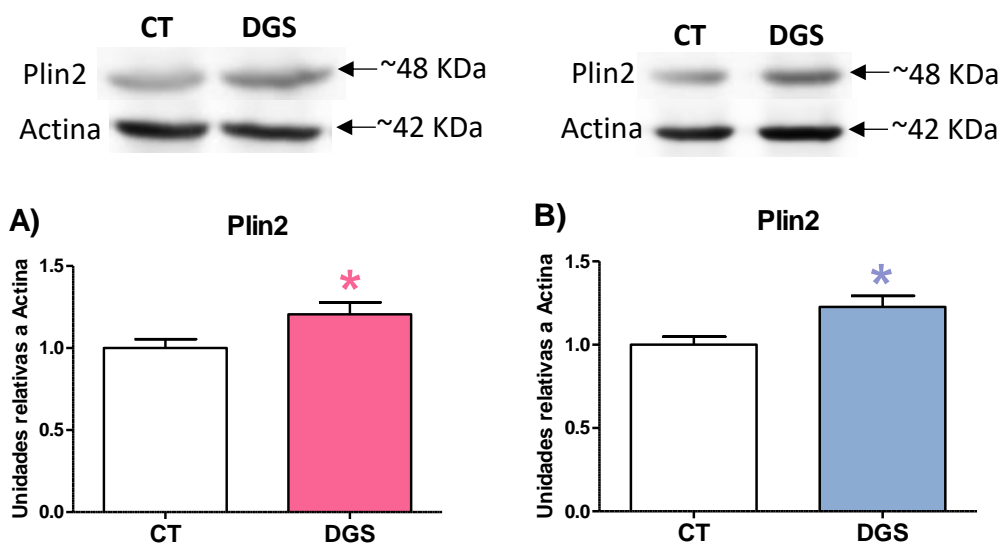
#### 4.3.2c Niveles proteicos de marcadores de hígado graso en el hígado de crías de 140 días de ratas CT y DGS.

Se evaluaron los niveles de algunas proteínas marcadoras de hígado graso en los hígados de crías de 140 días de edad mediante Western blot. Se evaluó la proteína de unión de ácidos grasos 4 (FABP4), involucrada en la absorción, transporte y metabolismo de ácidos grasos, y se observó un aumento en los hígados de crías de 140 días de edad de hembras ( $p < 0,05$ ) (**Figura 12A**) y machos ( $p < 0,05$ ) (**Figura 12B**) provenientes del grupo DGS, al compararlos con el grupo CT.



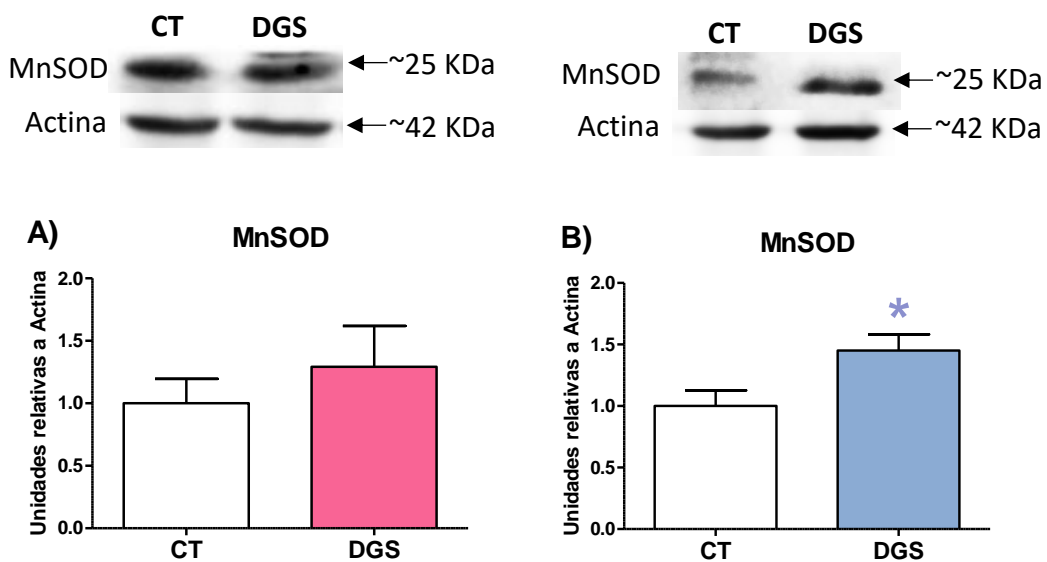
**Figura 12:** Niveles proteicos de FABP4 evaluados por Western blot relativos a actina de hígados A) hembras y B) machos de crías de 140 días de edad provenientes del grupo control (CT) y de grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). \* $p < 0,05$  con respecto al control.  $n = 6$ . Test estadístico: T-Student.

Al evaluar los niveles proteicos por Western blot de Plin2, se observó un aumento de la proteína en los hígados hembra ( $p < 0,05$ ) (**Figura 13A**) y macho ( $p < 0,05$ ) (**Figura 13B**) de crías de 140 días de edad provenientes del grupo DGS, en comparación con el grupo CT, de manera similar a lo observado mediante inmunohistoquímica (**Figura 10**).



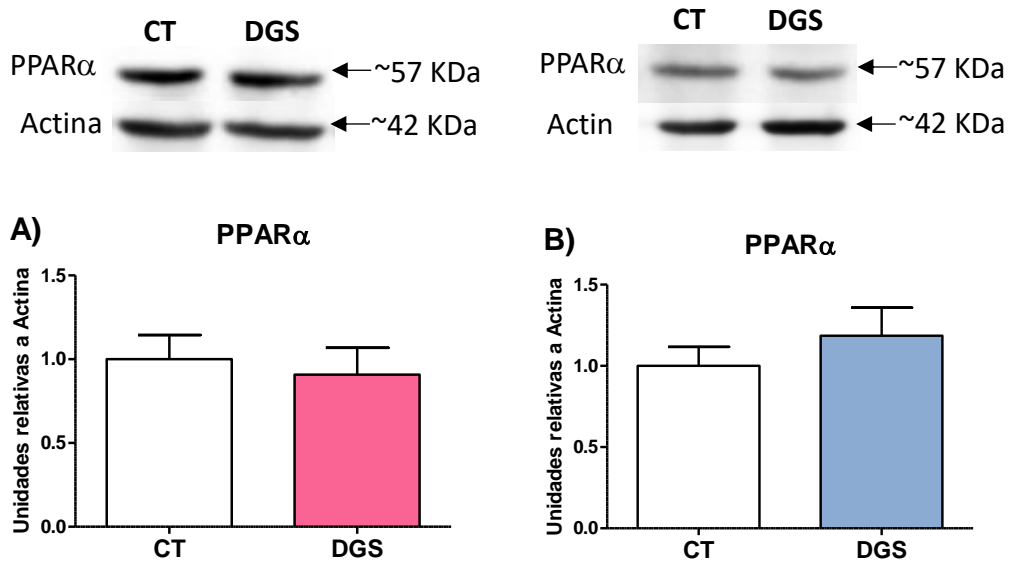
**Figura 13:** Niveles proteicos de Plin2 evaluados por Western blot relativos a actina de hígados A) hembras y B) machos de crías de 140 días de edad provenientes del grupo control (CT) y de grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). \* $p < 0,05$  con respecto al control.  $n = 6$ . Test estadístico: T-Student.

En los hígados de crías de 140 días de edad, se evaluaron los niveles de la enzima superóxido dismutasa manganeso (MnSOD), involucrada en la protección celular al daño oxidativo por especies reactivas del oxígeno. No se observaron cambios en las hembras provenientes del grupo DGS (**Figura 14A**), pero sí se observó un aumento en los niveles proteicos de MnSOD en los hígados de las crías macho provenientes del grupo DGS al compararlo con el grupo CT ( $p < 0,05$ ) (**Figura 14B**).



**Figura 14:** Niveles proteicos de MnSOD evaluados por Western blot relativos a actina de hígados A) hembras y B) machos de crías de 140 días de edad provenientes del grupo control (CT) y de grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). \* $p < 0,05$  con respecto al control.  $n = 6$ . Test estadístico: T-Student.

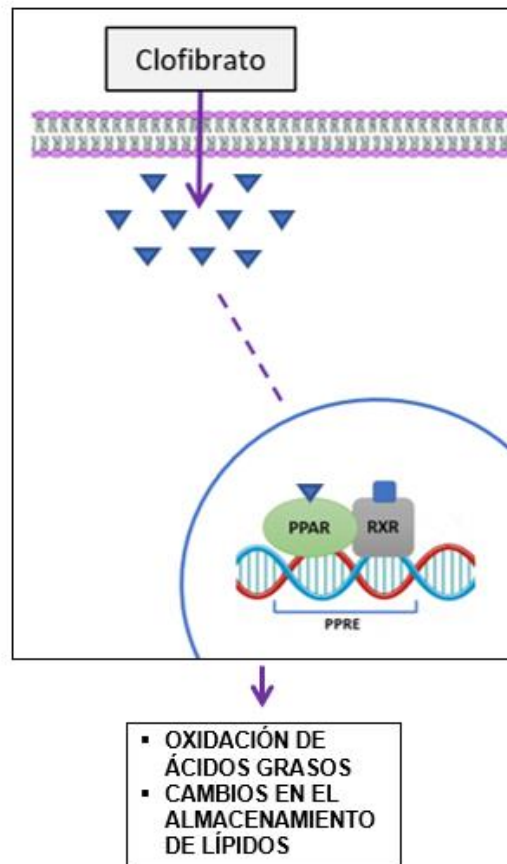
Además, se evaluaron los niveles proteicos de PPAR $\alpha$  y no se observaron diferencias en los hígados hembras y machos de crías de 140 días de edad, provenientes del grupo DGS al compararlo con el CT (**Figura 15**).



**Figura 15:** Niveles proteicos de PPAR $\alpha$  evaluados por Western blot relativos a actina de hígados A) hembras y B) machos de crías de 140 días de edad provenientes del grupo control (CT) y de grupo de dieta con exceso de grasas saturadas (DGS). n=6. Test estadístico: T-Student.

#### 4.4 Efectos de la activación de PPAR $\alpha$ sobre el metabolismo lipídico de explantos de hígado de fetos de 21 días de gestación y de hígados de las crías de 140 días de edad del grupo CT y del grupo DGS.

Al observar la desensibilización a los efectos catabólicos de leptina y dado que dichos efectos requieren la activación de PPAR $\alpha$  (Lee et al., 2002), nos resultó interesante investigar un modo de activar a PPAR $\alpha$  de manera independiente al accionar de la leptina, para dilucidar si la falta de acción de leptina se debía a alteraciones en la señalización de la adipocina o sobre la activación de PPAR $\alpha$  (**Esquema 6**).

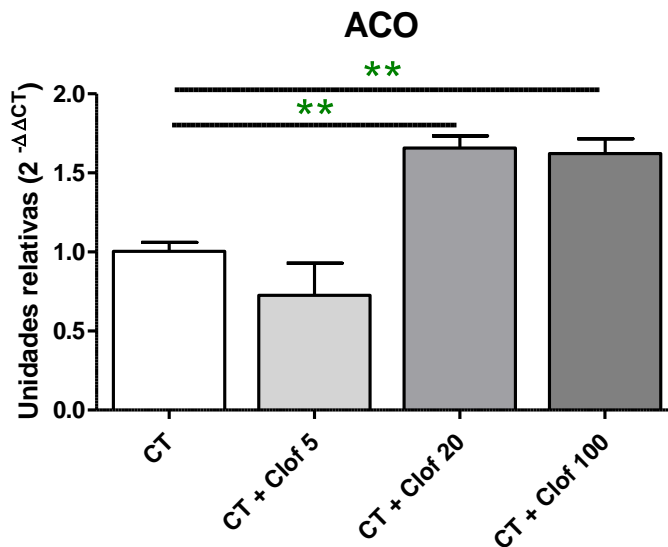


**Esquema 6:** Gráfico ilustrativo, mecanismo de acción del clofibrato.

#### 4.4.1 Determinación de la concentración óptima y especificidad para la activación de PPAR $\alpha$ .

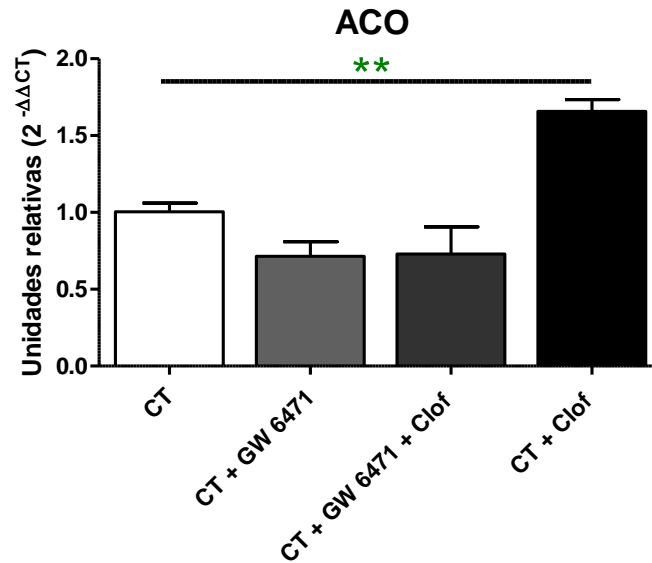
El Clofibrato es un conocido activador de PPAR $\alpha$  que induce el catabolismo de los lípidos. En primer lugar, se realizaron pruebas con distintas concentraciones de clofibrato para definir la concentración efectiva mínima que permita evidenciar su efecto catabólico sin llegar a saturar la respuesta. Para esto se cultivaron los explantos de hígados fetales de 21 días de gestación y de hígados de las crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo CT en presencia o no de clofibrato a distintas concentraciones, 5  $\mu$ M - 20  $\mu$ M - 100  $\mu$ M. Se analizaron los niveles de ARN mensajero de ACO, un gen involucrado en el catabolismo de los lípidos a modo de evidenciar el efecto de la activación de PPAR $\alpha$  en las distintas concentraciones de clofibrato. En los hígados fetales observamos un aumento de los niveles de ARN mensajero de ACO tanto del cultivo con clofibrato 20  $\mu$ M como del cultivo con

clofibrato 100  $\mu$ M con respecto al cultivo control sin adiciones ( $p < 0,01$ ) (**Figura 16**). No observamos diferencias al comparar el cultivo con clofibrato 5  $\mu$ M con respecto al cultivo control sin adiciones (**Figura 16**).



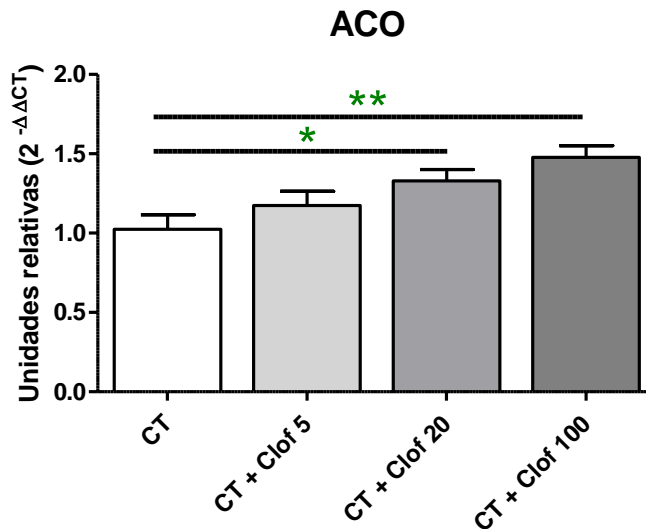
**Figura 16:** Niveles de ARN mensajero de ACO relativos a la media geométrica de los genes de referencia L30 y  $\beta$ 2 $\mu$ G evaluados por RT-qPCR en hígados de fetos de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo control cultivado con clofibrato 5  $\mu$ M (CT + Clof 5), con clofibrato 20  $\mu$ M (CT + Clof 20), con clofibrato 100  $\mu$ M (CT + Clof 100) o sin adiciones (CT). \*\* $p < 0,01$  con respecto al control sin adiciones.  $n = 6$ . Test estadístico: Anova de un factor, post-test Dunnett.

Al evaluar los resultados, decidimos que la concentración de clofibrato a utilizar es 20  $\mu$ M, la mínima en la cual pudimos observar el efecto inductor de ACO, gen blanco de PPAR $\alpha$ , por el accionar del clofibrato. Posteriormente, los hígados se cultivaron adicionando GW 6471 10 $\mu$ M, un antagonista de PPAR $\alpha$  que conduce al desplazamiento de los coactivadores de PPAR $\alpha$  y promueve el reclutamiento de proteínas co-represoras (Liu et al., 2016). Se cultivaron los explantos de hígados adicionando el antagonista y también adicionando tanto el antagonista como el Clofibrato 20 $\mu$ M. No se observan cambios en los niveles de ARN mensajero de ACO al adicionar solo GW 6471 al cultivo, ni cuando adicionamos el antagonista junto con el agonista de PPAR $\alpha$  con respecto al CT (**Figura 17**). Como se mencionó anteriormente, observamos un aumento de los niveles de ARN mensajero de ACO del cultivo con clofibrato 20  $\mu$ M con respecto al cultivo control sin adiciones ( $p < 0,01$ ) (**Figura 17**).



**Figura 17:** Niveles de ARN mensajero de ACO relativos a la media geométrica de los genes de referencia L30 y  $\beta$ 2 $\mu$ G evaluados por RT-qPCR hígados de fetos de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo control cultivado con GW6471 10 $\mu$ M (CT + GW6471), con GW6471 10 $\mu$ M y Clofibrato 20  $\mu$ M (CT + GW6471 + Clof), con Clofibrato 20  $\mu$ M (CT + Clof) o sin adiciones (CT). \*\*p<0,01 con respecto al control sin adiciones. n=6. Test estadístico: Anova de un factor, post-test Dunnett.

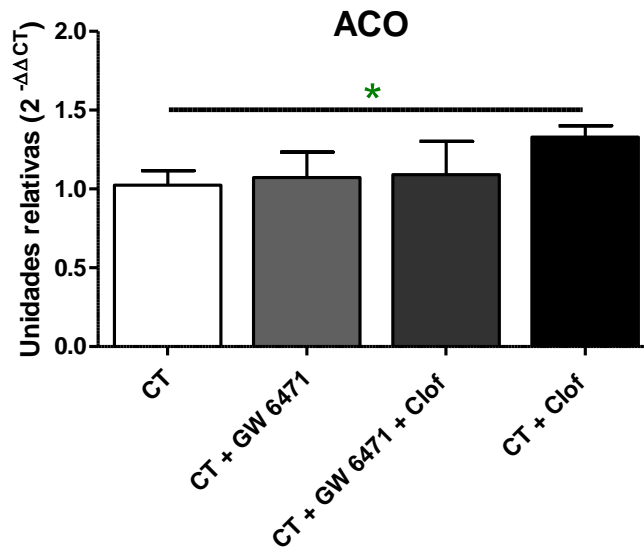
Al cultivar los hígados de las crías de 140 días de edad con las distintas concentraciones de clofibrato, observamos un aumento de los niveles de ARN mensajero de ACO en los cultivos con clofibrato 20  $\mu$ M (p<0,05) y de los cultivos con clofibrato 100  $\mu$ M (p<0,01) con respecto al cultivo control sin adiciones (**Figura 18**). No encontramos diferencias en los niveles de ARN mensajero de ACO entre el cultivo con 5  $\mu$ M y el cultivo control sin adiciones (**Figura 18**).



**Figura 18:** Niveles de ARN mensajero de ACO relativos a la media geométrica de los genes de referencia L30 y  $\beta 2\mu\text{G}$  evaluados por RT-qPCR en hígados de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control cultivado con clofibrato 5  $\mu\text{M}$  (CT + Clof 5), con clofibrato 20  $\mu\text{M}$  (CT + Clof 20), con clofibrato 100  $\mu\text{M}$  (CT + Clof 100) o sin adiciones (CT). \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  con respecto al control sin adiciones.  $n = 6$ . Test estadístico: Anova de un factor, post-test Dunnett.

Al igual que en el hígado fetal, decidimos que la concentración de clofibrato a utilizar es 20  $\mu\text{M}$ . Se cultivaron los explantos de hígado de crías de 140 días de edad adicionando el antagonista GW 6471 10 $\mu\text{M}$  y también adicionando tanto el antagonista como el Clofibrato 20 $\mu\text{M}$ . No se observan cambios en los niveles de ACO al adicionar GW 6471 al cultivo, ni cuando adicionamos el antagonista junto con el agonista de PPAR $\alpha$  con respecto al CT (**Figura 19**). Como se mencionó anteriormente, observamos un aumento de los niveles de ARN mensajero de ACO del cultivo con clofibrato 20  $\mu\text{M}$  con respecto al cultivo control sin adiciones ( $p < 0,05$ ) (**Figura 19**).



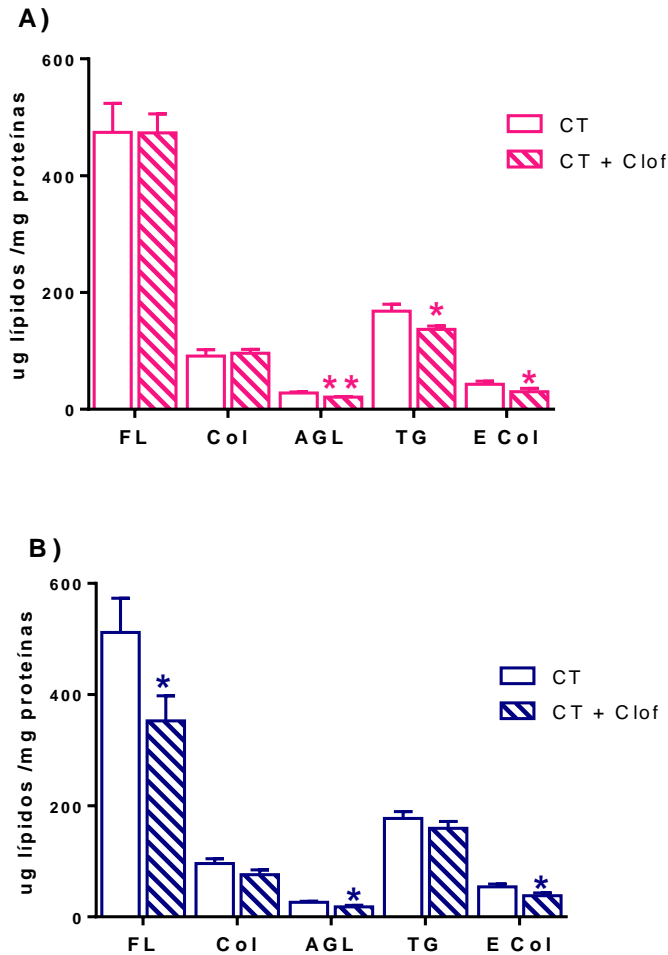


**Figura 19:** Niveles de ARN mensajero de ACO relativos a la media geométrica de los genes de referencia L30 y  $\beta$ 2 $\mu$ G evaluados por RT-qPCR en hígados de crías de 140 días de edad provenientes de ratas del grupo control cultivado con GW6471 10 $\mu$ M (CT + GW6471), con GW6471 10 $\mu$ M y Clofibrato 20  $\mu$ M (CT + GW6471 + Clof), con Clofibrato 20  $\mu$ M (CT + Clof) o sin adiciones (CT). \* $p$ <0,05.  $n$ =6 Test estadístico: Anova de un factor, post-test Dunnett.

Entonces se realizaron los cultivos de los hígados fetales al día 21 de gestación y de los hígados de las crías de 140 días de edad provenientes del grupo CT y del grupo DGS con clofibrato 20  $\mu$ M durante 3 horas en baño metabólico bajo atmosfera controlada.

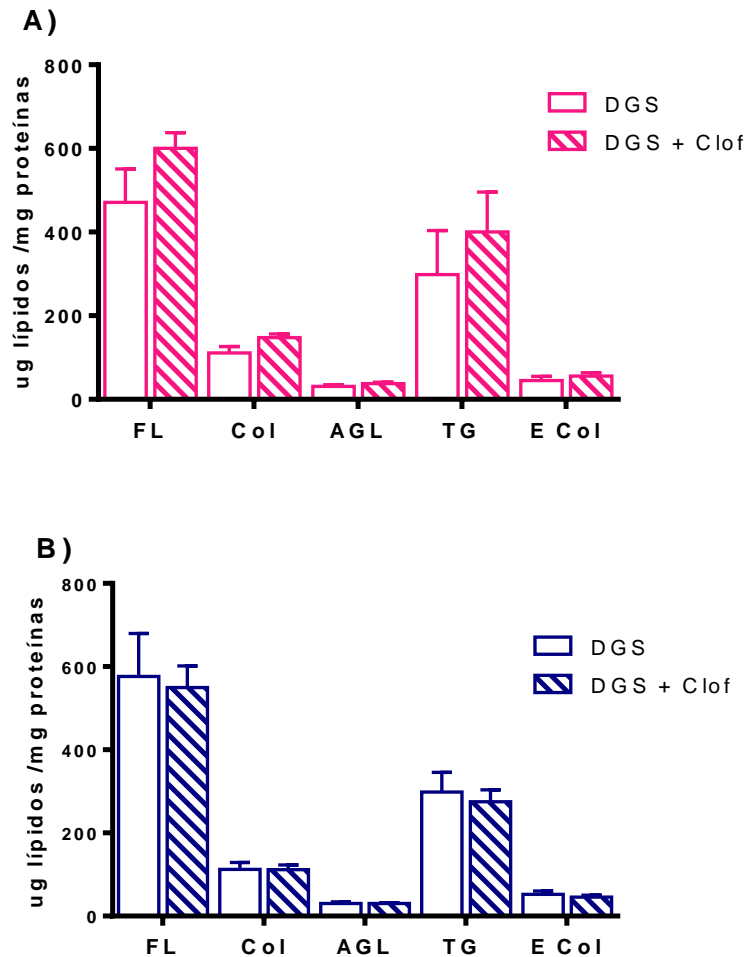
#### 4.4.2 Efecto de la activación de PPAR $\alpha$ en el cultivo de explantos de hígado de fetos al día 21 de gestación provenientes del grupo CT y del grupo DGS.

Luego del cultivo, se evaluaron los niveles lipídicos mediante cromatografía en capa delgada (TLC) en los hígados fetales. En el grupo CT observamos el efecto esperado del activador de PPAR $\alpha$  que disminuye los niveles de lípidos en los explantos hepáticos fetales. En las hembras hubo una disminución de los niveles de ácidos grasos libres ( $p$ <0,01), triglicéridos y ésteres de colesterol ( $p$ <0,05) (**Figura 20A**). En los hígados fetales macho del grupo control observamos una disminución de fosfolípidos, ácidos grasos libres y ésteres de colesterol por el agregado de clofibrato al cultivo ( $p$ <0,05) (**Figura 20B**).



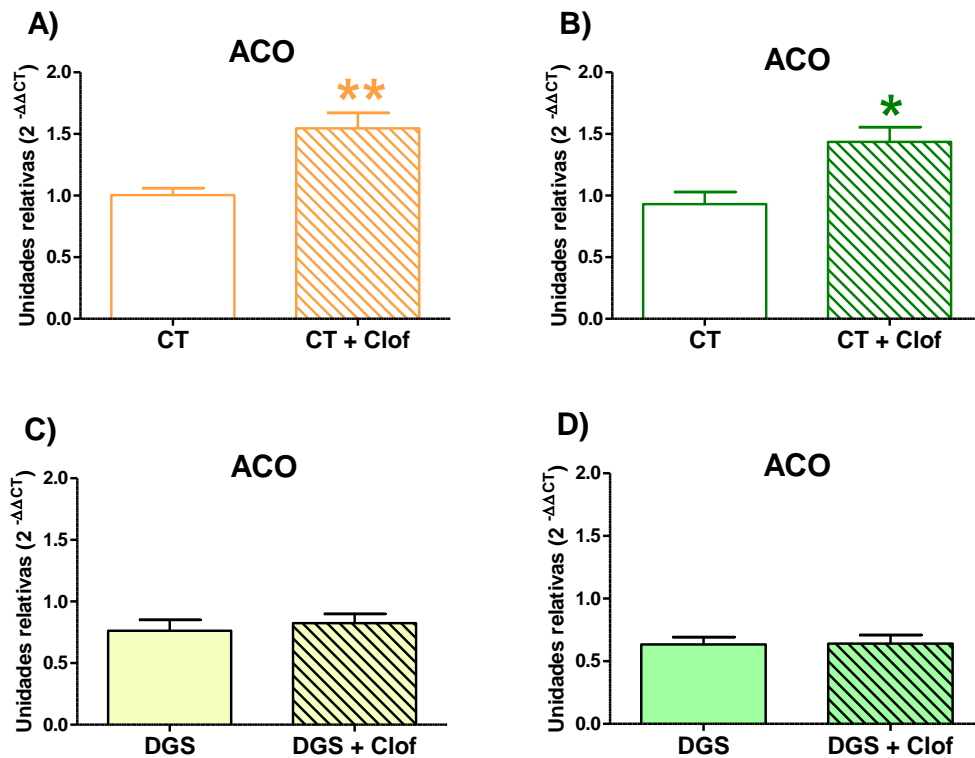
**Figura 20:** Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en el hígado de fetos A) hembras y B) machos de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo control cultivados sin adiciones (CT) y del grupo control cultivados con clofibrato 20  $\mu$ M (CT + Clof). \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  con respecto al control sin adiciones.  $n = 6$ . Test estadístico: t-student. TG: triglicéridos, Col: colesterol, AGL: ácidos grasos libres, E Col: ésteres de colesterol, FL: fosfolípidos.

A diferencia de lo ocurrido en el grupo CT, en los hígados fetales del grupo DGS no observamos cambios en los niveles lipídicos ni en hembras ni en machos debido a la adición de clofibrato al cultivo (**Figura 21**).



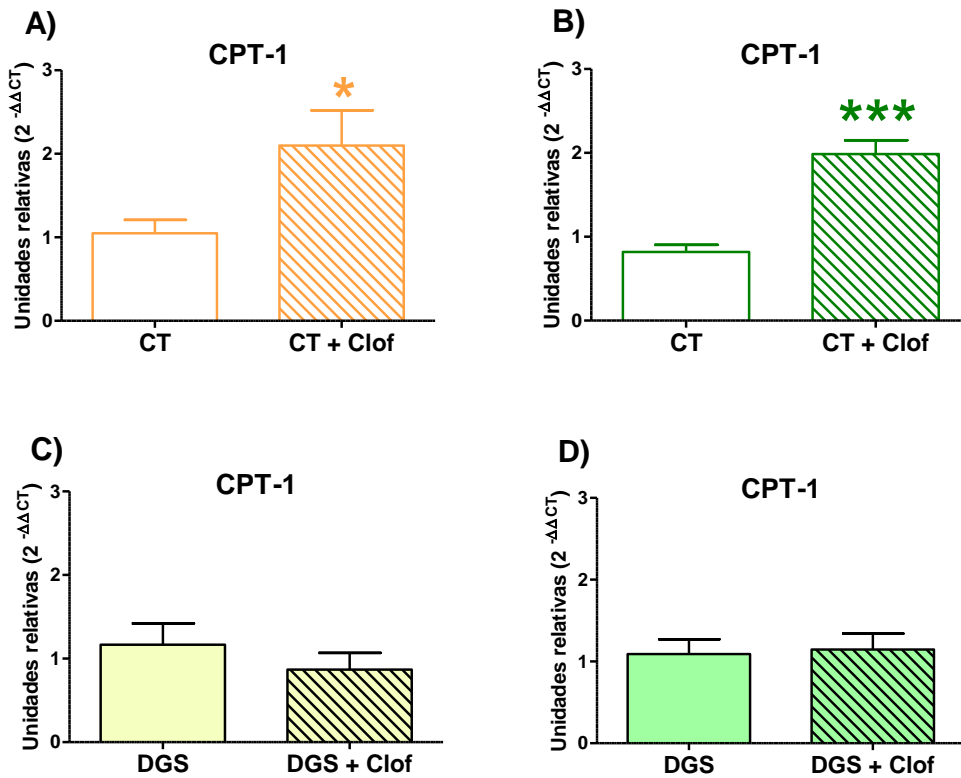
**Figura 21:** Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en el hígado de fetos A) hembras y B) machos de 21 días de gestación provenientes de ratas del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas cultivados sin adiciones (DGS) y cultivados con clofibrato 20  $\mu$ M (DGS + Clof). n=6. Test estadístico: t-student. TG: triglicéridos, Col: colesterol, AGL: ácidos grasos libres, E Col: ésteres de colesterol, FL: fosfolípidos.

El cultivo con clofibrato produjo un aumento en los niveles de ARN mensajero de ACO en los hígados fetales hembra ( $p < 0,01$ ) (**Figura 22A**) y macho ( $p < 0,05$ ) (**Figura 22B**) provenientes del grupo control. Este efecto no se observó en los hígados fetales provenientes del grupo DGS (**Figura 22C y D**).



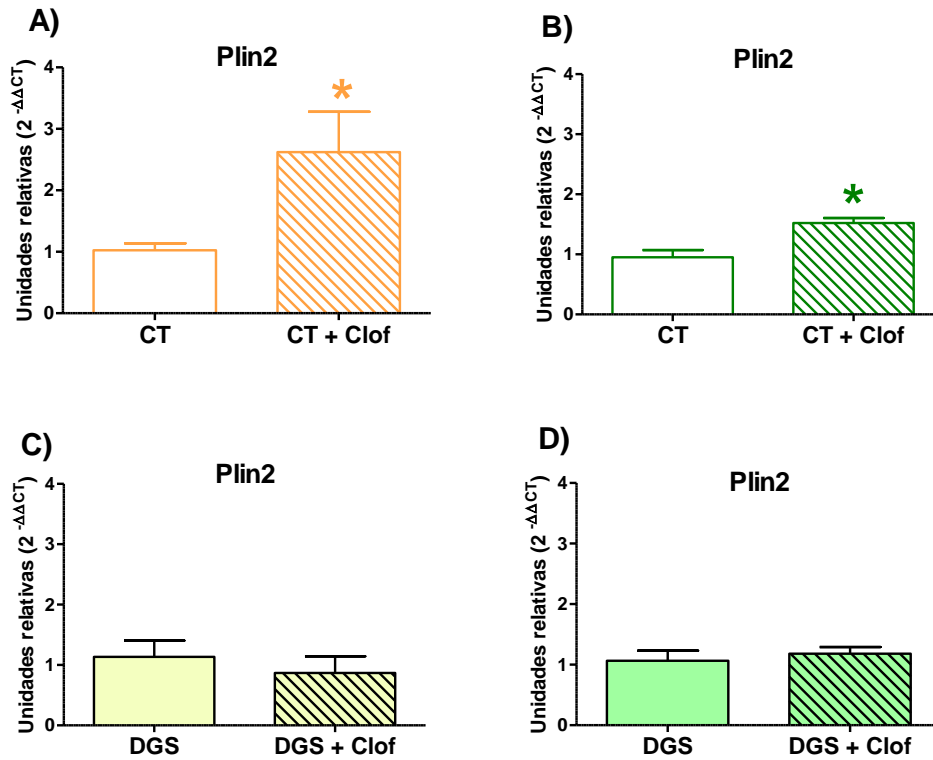
**Figura 22:** Niveles de ARN mensajero de ACO relativos a la media geométrica de los genes de referencia L30 y  $\beta 2\mu G$  evaluados por RT-qPCR en hígados fetales de 21 días de gestación del grupo control cultivado con clofibrato 20mM (CT + Clof) o sin adiciones (CT) A) hembras y B) machos, y del grupo DGS cultivado con clofibrato 20  $\mu$ M (DGS + Clof) o sin adiciones (DGS) C) hembras y D) machos. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  con respecto al control sin adiciones. Test estadístico: T-Student.

De igual forma, el cultivo con clofibrato produjo un aumento de los niveles de ARN mensajero de CPT-1 en los hígados fetales hembra ( $p < 0,05$ ) (**Figura 23A**) y macho ( $p < 0,001$ ) (**Figura 23B**) provenientes del grupo control. No se observaron diferencias en los hígados fetales provenientes del grupo DGS por el cultivo con clofibrato (**Figura 23C y D**).



**Figura 23:** Niveles de ARN mensajero de CPT-1 relativos a la media geométrica de los genes de referencia L30 y  $\beta 2\mu G$  evaluados por RT-qPCR en hígados fetales de 21 días de gestación del grupo control cultivado con clofibrato 20mM (CT + Clof) o sin adiciones (CT) A) hembras y B) machos, y del grupo DGS cultivado con clofibrato 20  $\mu M$  (DGS + Clof) o sin adiciones (DGS) C) hembras y D) machos. \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$ . Test estadístico: T-Student.

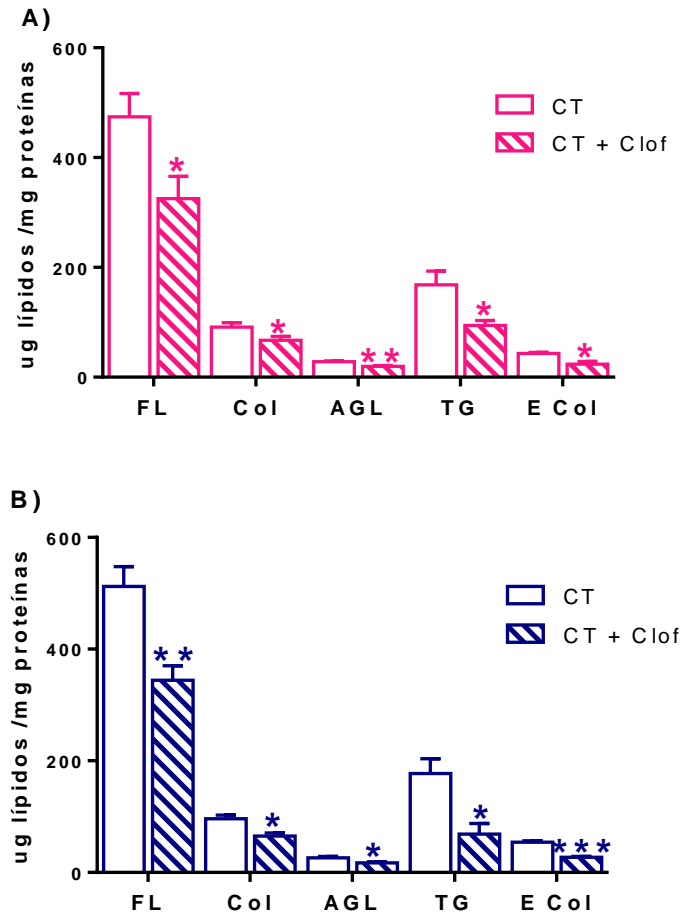
A pesar de que Plin2 está involucrada en la acumulación de lípidos, es un gen blanco de PPAR $\alpha$  que probablemente se induce frente a la necesidad de movilización de lípidos. Al evaluar los niveles de ARN mensajero de Plin2, observamos que la activación de PPAR $\alpha$  por clofibrato induce un aumento en dichos niveles en los hígados fetales hembra ( $p < 0,05$ ) (**Figura 24A**) y macho ( $p < 0,05$ ) (**Figura 24B**) del grupo CT, que no se evidencia en los hígados fetales provenientes del grupo DGS (**Figura 24C y D**).



**Figura 24:** Niveles de ARN mensajero de Plin2 relativos a la media geométrica de los genes de referencia L30 y  $\beta 2\mu G$  evaluados por RT-qPCR en hígados fetales de 21 días de gestación del grupo control cultivado con clofibrato 20mM (CT + Clof) o sin adiciones (CT) A) hembras y B) machos, y del grupo DGS cultivado con clofibrato 20  $\mu M$  (DGS + Clof) o sin adiciones (DGS) C) hembra y D) macho. \* $p < 0,05$ . Test estadístico: T-Student.

#### 4.4.3 Efecto de la activación de PPAR $\alpha$ en el cultivo de explantos de hígado de crías de 140 días de edad provenientes del grupo CT y del grupo DGS.

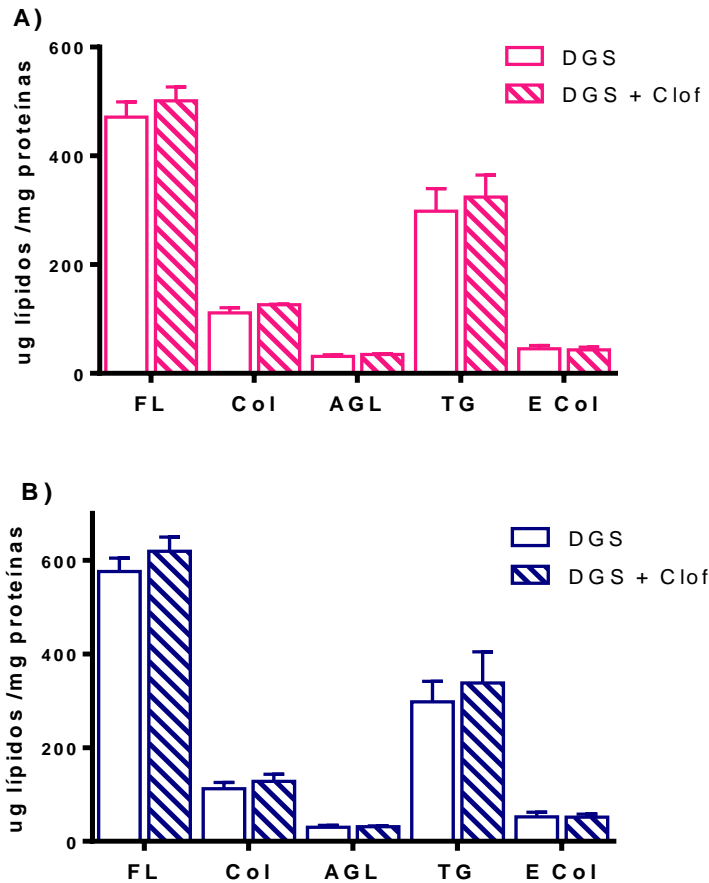
Luego del cultivo, se evaluaron los niveles lipídicos mediante TLC en los hígados de las crías de 140 días de edad de ambos grupos. De la misma manera que ocurre en los hígados fetales, en el grupo CT observamos una disminución en los niveles de todas las especies lipídicas analizadas en los hígados de crías hembra de 140 días de edad al cultivarlos en presencia clofibrato ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ) (**Figura 25A**). De manera similar, en los hígados de crías macho del grupo CT observamos una disminución de todas las especies lipídicas por la adición de clofibrato al medio de cultivo ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ) (**Figura 25B**).



**Figura 25:** Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en el hígado de crías de 140 días de edad de A) hembras y B) machos provenientes de ratas del grupo control cultivados sin adiciones (CT) y del grupo control cultivados con clofibrato 20  $\mu$ M (CT + Clof). \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  con respecto al control sin adiciones.  $n = 6$ . Test estadístico: t-student. TG: triglicéridos, Col: colesterol, AGL: ácidos grasos libres, E Col: ésteres de colesterol, FL: fosfolípidos.

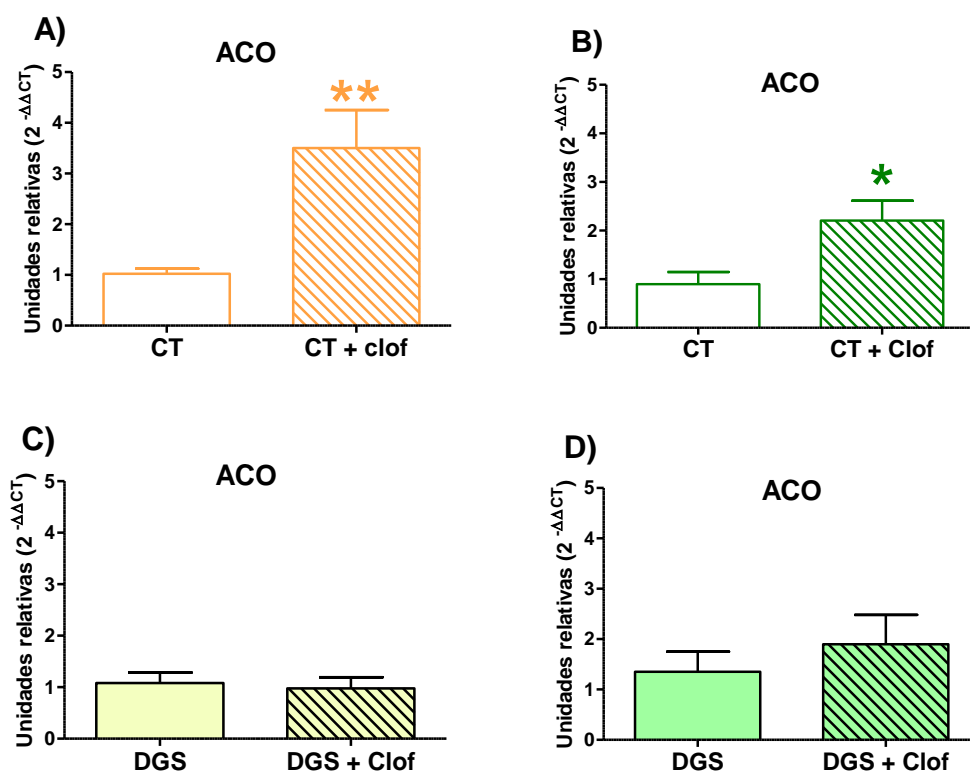
Por otro lado, en el grupo DGS los hígados de las crías de 140 días de edad no observamos cambios en los niveles lipídicos ni en hembras ni en machos por la adición de clofibrato al medio de cultivo (**Figura 26**).



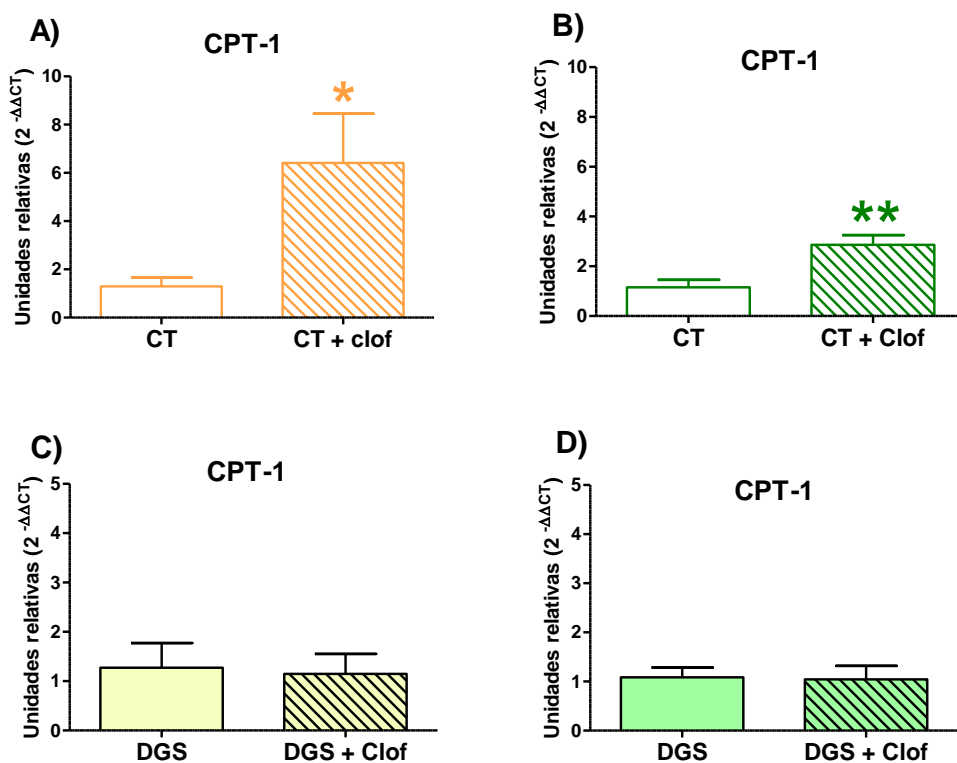


**Figura 26:** Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en el hígado de crías de 140 días de edad de A) hembras y B) machos provenientes de ratas del grupo de dieta con exceso de grasas saturadas cultivados sin adiciones (DGS) y cultivados con clofibrato 20  $\mu$ M (DGS + Clof). n=6. Test estadístico: t-student. TG: triglicéridos, Col: colesterol, AGL: ácidos grasos libres, E Col: ésteres de colesterol, FL: fosfolípidos.

En los hígados de 140 días de edad, el cultivo con clofibrato produjo un aumento en los niveles de ARN mensajero de ACO en hembra ( $p < 0,01$ ) (**Figura 27A**) y macho ( $p < 0,05$ ) (**Figura 27B**) provenientes del grupo control, que no se observó en el grupo DGS (**Figura 27C y D**). Además, al igual que en los explantos hepáticos fetales, se observó un aumento de los niveles de ARN mensajero de CPT-1 al cultivar con el agonista de PPAR $\alpha$  los hígados de las crías de 140 días de edad hembra ( $p < 0,05$ ) (**Figura 28A**) y macho ( $p < 0,01$ ) (**Figura 28B**) provenientes del grupo control que no se observó en los hígados provenientes del grupo DGS (**Figura 28C y D**).

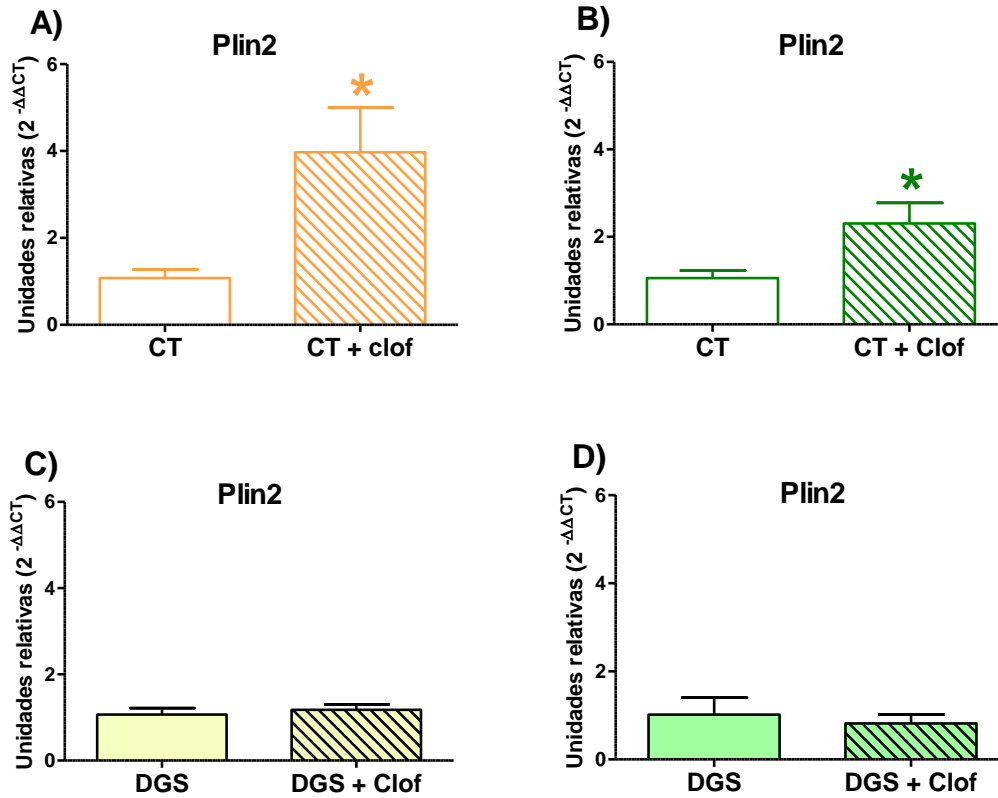


**Figura 27:** Niveles de ARN mensajero de ACO relativos a la media geométrica de los genes de referencia L30 y  $\beta 2\mu G$  evaluados por RT-qPCR en hígados de crías de 140 días de edad del grupo control cultivado con clofibrato 20mM (CT + Clof) o sin adiciones (CT) A) hembra y B) macho, y del grupo DGS cultivado con clofibrato 20  $\mu M$  (DGS + Clof) o sin adiciones (DGS) C) hembra y D) macho. \*p-valor<0,05 \*\*p-valor<0,01 con respecto al control sin adiciones. Test estadístico: T-Student.



**Figura 28:** Niveles de ARN mensajero de CPT-1 relativos a la media geométrica de los genes de referencia L30 y  $\beta 2\mu G$  evaluados por RT-qPCR en hígados de crías de 140 días de edad del grupo control cultivado con clofibrato 20mM (CT + Clof) o sin adiciones (CT) A) hembra y B) macho, y del grupo DGS cultivado con clofibrato 20  $\mu M$  (DGS + Clof) o sin adiciones (DGS) C) hembra y D) macho. \*p-valor<0,05 \*\*p-valor<0,01 con respecto al control sin adiciones. Test estadístico: T-Student.

Al evaluar los niveles de ARN mensajero de Plin2 en los hígados de crías de 140 días de edad, se observó un aumento en las crías hembra (p<0,05) (**Figura 29A**) y macho (p<0,05) (**Figura 29B**) provenientes del grupo CT al cultivarlos en presencia de clofibrato. En cambio, los hígados de las crías del grupo DGS no muestran cambios en los niveles de ARN mensajero de Plin2 debido a la adición del agonista de PPAR $\alpha$  al cultivo (**Figura 29C y D**).



**Figura 29:** Niveles de ARN mensajero de Plin2 relativos a la media geométrica de los genes de referencia L30 y  $\beta$ 2 $\mu$ G evaluados por RT-qPCR en hígados de crías de 140 días de edad del grupo control cultivado con clofibrato 20mM (CT + Clof) o sin adiciones (CT) A) hembras y B) machos, y del grupo DGS cultivado con clofibrato 20  $\mu$ M (DGS + Clof) o sin adiciones (DGS) C) hembras y D) machos. \*p-valor<0,05 con respecto al control sin adiciones. Test estadístico: T-Student.

## 5. DISCUSIÓN

En este trabajo final utilizamos un modelo establecido previamente de sobreingesta materna de grasas saturadas en rata para el estudio de alteraciones metabólicas inducidas durante la gestación y la lactancia, y asociadas al sobrepeso. El objetivo de este tratamiento fue reproducir algunas de las características presentes en mujeres que quedan embarazadas con sobrepeso y obesidad con la finalidad de estudiar alteraciones metabólicas inducidas durante la gestación en estas patologías, que afectan la salud metabólica de la descendencia.

Se utilizó una dieta con un 25% de grasas saturadas que representa el 45% de aporte calórico total. De acuerdo con el corto ciclo de vida y tiempo reproductivo de los roedores, las dietas que inducen sobrepeso deben tener entre 30-60% de contenido calórico proveniente de grasas para ser efectivas. En el modelo utilizado, el 45% de las calorías provienen de la grasa, valor intermedio en comparación al de otras dietas con exceso de grasas utilizadas en roedores (Carpenter et al., 2013, Niculescu and Lupu, 2009, Ghibaudi et al., 2002). Mediante la administración de esta dieta se logró un incremento de un 9% de peso de manera previa a la gestación, valor similar al observado en otros modelos con 40 y 45% de aporte calórico por parte de las grasas (Reynolds et al., 2015, Ferezou-Viala et al., 2007, Ghibaudi et al., 2002) y menor respecto al observado en roedores alimentados con dietas que contienen un 60% de grasas como aporte calórico (Carpenter et al., 2013, Liang et al., 2010, Niculescu and Lupu, 2009).

En el grupo alimentado con la dieta rica en grasas saturadas registramos una mayor ganancia de peso previo a la gestación y durante la gestación, al compararlo con el grupo control. En el grupo DGS observamos un mayor número de fetos y un aumento del peso corporal del feto, lo que contribuye al mayor aumento de peso en los últimos días de la gestación, al compararlo con el grupo control. De manera similar, en gestantes humanas obesas hay un mayor peso previo a la gestación y un incremento en el peso del neonato, comparadas con gestantes con normopeso (Catalano et al., 2009, Gaillard et al., 2013).

En relación a los parámetros metabólicos plasmáticos, hemos observado una mayor trigliceridemia materna pero no hay diferencias ni en la glucemia ni en la colesterolemia. Se observó anteriormente en el modelo utilizado, que las ratas gestantes alimentadas con la dieta

rica en grasas saturadas presentaban resistencia a insulina (Mazzucco et al., 2013). Esta resistencia a la insulina y la presencia de elevados niveles de triglicéridos en circulación son características frecuentes en gestantes con sobrepeso u obesidad (Marseglia et al., 2014, Catalano et al., 2009).

En cuanto a los fetos provenientes del grupo DGS, encontramos una mayor glucemia, trigliceridemia y colesterolemia, tal como previamente (Mazzucco et al., 2013). Los triglicéridos provendrían principalmente de la circulación materna a través de un incrementado transporte placentario, hemos encontrado un incremento en la expresión de la lipoproteína lipasa placentaria, involucrada en el transporte de lípidos hacia el feto en desarrollo, similar a lo evidenciado en otros modelos (Diaz et al., 2015, Zhu et al., 2010). Por otro lado, los altos niveles de glucemia e insulinemia de este modelo, denotan insulino-resistencia fetal lo que podría contribuir con los altos niveles de lípidos circulantes en el feto (Mazzucco et al., 2013). Resultados similares fueron hallados en gestantes humanas con sobrepeso, con insulinemia materna y en cordón fetal elevada, indicando resistencia a insulina en la madre y el feto y con altos niveles de lípidos circulantes en el cordón fetal en la gestación a término (Acosta et al., 2015, Guo, 2014, Catalano et al., 2009).

El hígado es un órgano clave involucrado en la recepción, el almacenamiento y la re-circulación de lípidos (Rui, 2014). Es por esto que pusimos nuestro interés en evaluar las anomalías ocasionadas por la dieta materna en los hígados tanto de los fetos como de las crías adultas de 140 días de edad. En condiciones de alta concentración de lípidos circulantes y resistencia a la insulina, se afecta el metabolismo de lípidos en el tejido adiposo, lo que genera hiperlipidemia y una mayor incorporación hepática de lípidos (Heindel et al., 2017). Dado que anteriormente se observó una sobreacumulación lipídica en el hígado (Mazzucco et al., 2013), nos interesó evaluar los niveles de ARN mensajero y de proteína de Plin2, que forma parte de la superficie de las gotas lipídicas maduras y de gran tamaño, involucrada en el tráfico interno de lípidos y que se encuentra incrementada en patologías caracterizadas por hígado graso (Sahini and Borlak, 2016, Guilherme et al., 2008). No encontramos diferencias en los niveles de ARN mensajero en los hígados fetales del grupo DGS con respecto al control, sin embargo, se observó un aumento en los niveles proteicos, sin observarse cambios en su localización debido a la dieta grasa materna. Al igual que en este trabajo, en otros modelos de obesidad materna no se han observado cambios a nivel del ARN mensajero de Plin2 en

presencia de acumulación lipídica en el hígado de los fetos (Dahlhoff et al., 2014), aunque sí de la proteína lo que indicaría una mayor estabilidad de la proteína en presencia de sobreacumulación lipídica (Onal et al., 2017). Plin2 es muy importante para el desarrollo del hígado graso en modelos experimentales de obesidad y se ha propuesto que sea marcador de las etapas crónicas de la enfermedad indicando esteatosis severa (Pawella et al., 2014, McManaman et al., 2013).

La sobreacumulación de lípidos en el hígado de los fetos y la disminución en la expresión de enzimas del catabolismo de lípidos visto anteriormente (Mazzucco et al., 2013, Mazzucco et al., 2016), junto con el incremento observado en este trabajo en los niveles de Plin2, son alteraciones metabólicas compatibles con el desarrollo prematuro de la enfermedad de hígado graso, caracterizada por la acumulación de lípidos y por un ambiente pro-inflamatorio y pro-oxidante (Trovato et al., 2014). En los hígados fetales provenientes del grupo DGS se observó un aumento en los niveles de 4HNE al compararlo con el grupo control, lo que indicaría mayor peroxidación lipídica y la presencia de un ambiente pro-oxidante, evidenciando daño tisular por estrés oxidativo como ha sido descrito (Mota et al., 2016). El exceso de ácidos grasos saturados y sus derivados celulares inducen lipotoxicidad mediada por estrés del retículo endoplásmico, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, eventos que resultan en un aumento de las especies reactivas del oxígeno y por lo tanto en una mayor peroxidación lipídica (Mota et al., 2016, Fernandez-Sanchez et al., 2011). Todas estas alteraciones indican que la exposición *in utero* a una dieta materna rica en grasas saturadas induce alteraciones hepáticas compatibles con la enfermedad de hígado graso no alcohólico. En las gestantes con obesidad o sobrepeso se evidencia un ambiente pro-inflamatorio y pro-oxidante, que se perpetúa a través de las generaciones, programando alteraciones metabólicas en la descendencia como el hígado graso (Vickers, 2014, Zhou and Pan, 2015).

En la descendencia adulta del modelo, no se encontraron cambios en glucemia, trigliceridemia o colesterolemia, ni tampoco diferencias en el peso corporal y del hígado. Al parecer, la dieta normograsa luego del destete, normaliza su peso y sus parámetros plasmáticos. Sin embargo, hay una sobreacumulación hepática lipídica y una disminución de los principales genes del catabolismo de los lípidos (Mazzucco et al., 2016). Como se ha mencionado anteriormente la acumulación de lípidos podría estar generando un ambiente pro-oxidante, encontramos niveles elevados de 4HNE en los hígados de las crías adultas,



evidenciando una vez más un aumento en la lipoperoxidación y daño por exposición a un ambiente pro-oxidativo en el grupo DGS. También observamos un incremento en los niveles proteicos de MnSOD en los machos del grupo DGS, lo que podría ser una respuesta adaptativa dado el ambiente pro-inflamatorio y pro-oxidante del hígado de la cría del grupo DGS. Así y todo, los niveles incrementados de MnSOD no parecen ser suficientes para paliar el daño pro-oxidante observado en el hígado de la cría de ratas del grupo DGS. Otros autores han observado daño pro-oxidante y pro-inflamatorio en los hígados de la descendencia de rata obesa, indicando el inicio del desarrollo de la enfermedad de hígado graso (Alfaradhi et al., 2014, Bruce et al., 2009, Hughes and Oxford, 2014). Más aún, encontramos elevados niveles proteicos hepáticos de FABP4 y Plin2, involucradas en la absorción y transporte transcelular e intracelular (Mashek, 2013, Onal et al., 2017) de lípidos en hembras y machos del grupo DGS. La dieta materna rica en grasas saturadas podría programar un incremento en los niveles de estas proteínas proveyendo al hígado de las crías de un sistema de incorporación y acumulación de lípidos que podría ser el origen de la sobreacumulación hallada en la descendencia adulta del grupo DGS y el inicio de la enfermedad de hígado graso. Otros trabajos presentan resultados similares restringiendo la exposición a la dieta con alto contenido graso a la gestación y/o a la lactancia, lo que señala la alta susceptibilidad del período intrauterino y posnatal temprano a la programación de anomalías metabólicas (Davenport and Cabrero, 2009, Shankar et al., 2008, Jawerbaum and White, 2017).

La enfermedad de hígado graso se caracteriza entonces por presentar acumulación lipídica y daño tisular relacionado con un ambiente pro-inflamatorio y pro-oxidante. Un nexo entre estos eventos es el receptor nuclear y factor de transcripción PPAR $\alpha$ . Esta isoforma de PPAR activa el catabolismo de lípidos e induce la expresión de enzimas antioxidantes y de detoxificación celular (Marseglia et al., 2014, Trovato et al., 2014, McMullen et al., 2014). En nuestro modelo, los fetos y la cría adulta de ratas alimentadas con dieta grasa presentaron niveles de ARN mensajero de PPAR $\alpha$  similares a los del grupo control (mostrado en “Antecedentes” y (Mazzucco et al., 2016)). En este trabajo encontramos que no hay diferencias en cuanto a la expresión proteica de PPAR $\alpha$  en los hígados de la cría adulta del grupo DGS con respecto al grupo control, lo que podría sugerir que las alteraciones programadas por la dieta materna rica en grasas saturadas no estarían vinculadas a la expresión de PPAR $\alpha$ , sino que serían independientes o involucrarían anomalías en su

activación. Trabajos previos del laboratorio sugieren alteraciones en las vías del catabolismo de lípidos activadas por PPAR $\alpha$ ; los niveles de ACO como de CPT-1, genes clave en la  $\beta$ -oxidación de lípidos y blanco de PPAR $\alpha$ , presentan baja expresión en los hígados de fetos y crías del grupo DGS. Más aún, en esos estudios hemos encontrado anomalías al estimular las vías del catabolismo de lípidos en el hígado fetal del grupo DGS. Como se ha reportado, la leptina, un activador de la  $\beta$ -oxidación de lípidos vía PPAR $\alpha$  (Lee et al., 2002), no logra activar la  $\beta$ -oxidación de lípidos en los hígados fetales del grupo DGS, lo que sugiere una resistencia a las acciones lipolíticas de la leptina en las que interviene PPAR $\alpha$  (Mazzucco et al., 2016). Siguiendo la línea de investigación, nos resultó interesante estudiar un modo de activar a PPAR $\alpha$  de manera independiente al accionar de la leptina. Es por esto que se decidió activar a PPAR $\alpha$  mediante el cultivo de los hígados con su agonista farmacológico, el clofibrato. La concentración de clofibrato que resultó mínima efectiva fue 20  $\mu$ M, similar a otros trabajos realizados en hígado fetal y de rata adulta (Martinez et al., 2011b, Tamura et al., 2006). El GW6471 inhibió la activación de PPAR $\alpha$  por clofibrato, sin efectos sobre la expresión basal de ACO, lo que corrobora la especificidad de clofibrato sobre la activación de PPAR $\alpha$ .

Mediante la activación de PPAR $\alpha$ , en los hígados fetales provenientes del grupo CT se observó una disminución de los niveles lipídicos tal como previamente (Martinez et al., 2011b). En cuanto a los niveles de ARN mensajero de los genes blanco de PPAR $\alpha$ , en los hígados fetales del grupo CT se observó el efecto esperado por la activación de este factor de transcripción, un aumento en los niveles de ACO, CPT-1 y Plin2 por el agregado de clofibrato al cultivo (McMullen et al., 2014). Esto no ocurre en los hígados fetales provenientes del grupo DGS, en los que el clofibrato no activa las vías lipolíticas hepáticas.

De la misma manera, en los hígados de la descendencia adulta provenientes del grupo CT se observó una disminución de los niveles lipídicos por la activación de PPAR $\alpha$  y un aumento en los niveles de ARN mensajero de los genes blanco de PPAR $\alpha$  evaluados, ACO, CPT-1 y Plin2. Nuevamente, los hígados de la descendencia adulta de rata alimentada con una dieta enriquecida en grasas saturadas se mostró resistente al accionar del clofibrato.

Es muy notable que la descendencia del grupo DGS muestra indicadores de la enfermedad de hígado graso a pesar de haber ingerido una dieta correctamente balanceada

desde el destete, poniendo de relevancia el rol de la programación metabólica en etapas clave del desarrollo. Todos estos resultados señalan la importancia de la correcta regulación de las vías lipolíticas en el hígado y de controlar así posibles alteraciones del tejido por lipotoxicidad y consecuente daño por exposición a un ambiente pro-inflamatorio y pro-oxidante. Aún más importante y preocupante es que los hígados con sobreacumulación lipídica del grupo DGS se muestren refractarios a la activación de PPAR $\alpha$  por clofibrato. Es sabido que humanos adultos con enfermedad de hígado graso son tratados con fibratos de manera oral para la corrección del metabolismo hepático. Al parecer, esta terapia es efectiva en muchos casos sola o en combinación con algún otro medicamento como estatinas, hipoglucemiantes orales y análogos de incretinas usados para el tratamiento del síndrome metabólico cuando el individuo desarrolla la enfermedad por malos hábitos alimenticios (Fruchart et al., 2001, Taniguchi et al., 2001). En nuestro trabajo, si bien sólo se hicieron trabajos *in vitro*, se pone de manifiesto que cuando el origen de la enfermedad de hígado graso es la programación metabólica debido a una alimentación materna inadecuada, la terapia con agonistas de PPAR $\alpha$  podría no ser efectiva. Magliano y colaboradores trataron la descendencia de ratas alimentadas con dieta grasa con benzafibrato con resultados positivos, sin embargo, este modelo se obtiene alimentando con dieta grasa a la madre y también a la cría luego del destete (Magliano et al., 2013). En este trabajo final se evidencia la programación de la falta de respuesta a un importante modulador del metabolismo de lípidos como es el PPAR $\alpha$ , resaltando la necesidad del estudio de la historia del paciente de manera de establecer una terapia acorde con las características de cada persona con el objetivo de desarrollar estrategias personalizadas diferentes para cada individuo.

## 6. CONCLUSIÓN

En este trabajo hemos evaluado el efecto del sobrepeso materno debido a una dieta rica en grasas saturadas sobre el metabolismo de lípidos en el hígado del feto y de la descendencia adulta. Hemos evidenciado que la sobreingesta materna de grasas saturadas induce no solo un incremento en la trigliceridemia y en el peso materno, sino también un incremento del peso y de los lípidos circulantes fetales. En el hígado fetal, hemos observado un aumento de los niveles proteicos de Plin2 en el grupo DGS, indicador de mayor almacenamiento de lípidos. Además, se ha observado un incremento de los niveles de 4HNE en el grupo DGS en el hígado fetal, indicando mayor peroxidación lipídica y daño tisular por estrés oxidativo.

La descendencia adulta del grupo DGS no presenta diferencias de peso y parámetros plasmáticos de lípidos y glucosa, probablemente debido al consumo de una dieta normograsa luego del destete, pero aún así su hígado presenta alteraciones metabólicas. En el hígado de las crías adultas del grupo DGS, observamos un aumento de los niveles proteicos de Plin2 y FABP4, un incremento de los niveles de 4HNE, evidenciando un mayor transporte y acumulación de lípidos, y un ambiente pro-oxidante y pro-inflamatorio en el hígado. A pesar de la apariencia normal de las crías, se han programado las alteraciones metabólicas hepáticas, lo que pone en relevancia una mayor susceptibilidad de desarrollar patologías metabólicas por programación intrauterina debido al sobrepeso materno.

Hemos evaluado el efecto de la activación de PPAR $\alpha$  por un agonista farmacológico, el clofibrato, sobre el metabolismo de lípidos en el hígado de los fetos y de la descendencia adulta. Tanto en el hígado de fetos como de la descendencia adulta, en el grupo control se activa PPAR $\alpha$  y se observa una disminución de los niveles lipídicos y un aumento de los niveles de ARN mensajero de genes blanco de PPAR $\alpha$  involucrados en el metabolismo lipídico, ACO, CPT-1 y Plin2. Estos resultados no se evidencian en el grupo DGS, observando que no hay diferencias por el cultivo con clofibrato en los niveles lipídicos ni en los niveles de ARN mensajero de ACO, CPT-1 y Plin2 en los hígados fetales y de la descendencia adulta. Se evidenció una falta de respuesta de la activación de PPAR $\alpha$  por el

cultivo con clofibrato en los hígados de los fetos y de la descendencia de rata alimentada con una dieta rica en grasas saturadas debido a la programación de anomalías metabólicas.

La mayor susceptibilidad de la población a desarrollar patologías metabólicas debido al sobrepeso o a la obesidad materna es un factor muy importante que está siendo estudiado desde ya algunos años. Este trabajo refleja la importancia de la nutrición materna en la salud de la descendencia. El entorno materno adverso impacta sobre la salud fetal programando alteraciones metabólicas hepáticas en la descendencia. En este trabajo final se evidencia la programación de la falta de respuesta a un importante modulador del metabolismo de lípidos como es PPAR $\alpha$ , resaltando la necesidad del estudio de la historia del paciente de manera de establecer una terapia acorde con las características de cada persona con el objetivo de desarrollar estrategias personalizadas diferentes para cada individuo. Existe hoy en día un gran desarrollo farmacológico para el tratamiento del hígado graso no alcohólico, que incluye a los fibratos agonistas de PPAR $\alpha$ . Sin embargo, este trabajo muestra que en el caso en el que el fenotipo de hígado graso no alcohólico se desarrolla por programación materna, el tratamiento con fibratos podría no resultar efectivo.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Cuando el origen de la enfermedad de hígado graso es la programación metabólica debido a una alimentación materna inadecuada, las alteraciones hepáticas de esta patología podrían no ser revertidas por las terapias conocidas que involucran la activación de PPAR $\alpha$ . En primer lugar, a partir de los resultados obtenidos, nos parece interesante evaluar *in vivo* una terapia con agonistas de PPAR $\alpha$  para corroborar si ésta puede ser efectiva. Luego, nuestro objetivo para los próximos trabajos es buscar algún agente natural o farmacológico capaz de anular o atenuar las anomalías inducidas por la programación intrauterina en el hígado de la descendencia. Otros autores sugieren que la sobreactivación de PPAR $\alpha$  podría ocasionar un aumento del estrés oxidativo y daño tisular en consecuencia. Pensamos que una buena terapia podría incluir una combinación de agentes para que alguno promueva la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y que otro reduzca el estrés oxidativo. Además, nos interesa evaluar a futuro la implicancia de las modificaciones epigenéticas tanto en la madre con sobrepeso u obesidad, como en los fetos y la descendencia para evaluar si estas marcas epigenéticas pueden ser programadas en etapas tempranas del desarrollo.

Las evidencias actuales apoyan la necesidad de implementar estrategias de prevención eficaces para la obesidad, con el fin de frenar la tendencia ascendente y las formas más costosas de tratamiento médico y quirúrgico. La mayor parte de las estrategias que se utilizan actualmente se implementan después de que la obesidad ya está establecida. Estas estrategias preventivas deben iniciarse con la identificación temprana de los sujetos de mayor riesgo y poner el foco especialmente en las mujeres de manera previa y durante la gestación. En este contexto es esencial que entendamos mejor los factores que contribuyen el desarrollo de la obesidad en los primeros años de vida y cuál es el momento de hacer algo al respecto.

- ABDEL-MISIH, S. R. & BLOOMSTON, M. 2010. Liver anatomy. *Surg Clin North Am*, 90, 643-53.
- ABUMRAD, N., COBURN, C. & IBRAHIMI, A. 1999. Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim Biophys Acta*, 1441, 4-13.
- ACOSTA, O., RAMIREZ, V. I., LAGER, S., GACCIOLI, F., DUDLEY, D. J., POWELL, T. L. & JANSSON, T. 2015. Increased glucose and placental GLUT-1 in large infants of obese nondiabetic mothers. *Am J Obstet Gynecol*, 212, 227 e1-7.
- AL-RASADI, K., RIZZO, M., MONTALTO, G. & BERG, G. 2015. Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Cardiovascular Risk, and Carotid Inflammation. *Angiology*, 66, 601-3.
- ALFARADHI, M. Z., FERNANDEZ-TWINN, D. S., MARTIN-GRONERT, M. S., MUSIAL, B., FOWDEN, A. & OZANNE, S. E. 2014. Oxidative stress and altered lipid homeostasis in the programming of offspring fatty liver by maternal obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 307, R26-34.
- AMBROSINI, G. L. 2014. Childhood dietary patterns and later obesity: a review of the evidence. *Proc Nutr Soc*, 73, 137-46.
- BARAK, Y., NELSON, M. C., ONG, E. S., JONES, Y. Z., RUIZ-LOZANO, P., CHIEN, K. R., KODER, A. & EVANS, R. M. 1999. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*, 4, 585-95.
- BARKER, D. J. 2007. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med*, 261, 412-7.
- BARKER, D. J., GLUCKMAN, P. D., GODFREY, K. M., HARDING, J. E., OWENS, J. A. & ROBINSON, J. S. 1993. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*, 341, 938-41.
- BARKER, D. J. & OSMOND, C. 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*, 1, 1077-81.
- BARKER, D. J., WINTER, P. D., OSMOND, C., MARGETTS, B. & SIMMONDS, S. J. 1989. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*, 2, 577-80.
- BEN M'BAREK, K., AJAJI, D., CHORLAY, A., VANNI, S., FORET, L. & THIAM, A. R. 2017. ER Membrane Phospholipids and Surface Tension Control Cellular Lipid Droplet Formation. *Dev Cell*, 41, 591-604 e7.
- BENYSHEK, D. C. 2013. The "early life" origins of obesity-related health disorders: new discoveries regarding the intergenerational transmission of developmentally programmed traits in the global cardiometabolic health crisis. *Am J Phys Anthropol*, 152 Suppl 57, 79-93.
- BERGER, J. & MOLLER, D. E. 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*, 53, 409-35.
- BERGER, N. A. 2014. Obesity and cancer pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1311, 57-76.
- BLIGH, E. G. & DYER, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37, 911-7.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRAY, G. A. 2004. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 2583-9.
- BRUCE, K. D., CAGAMPANG, F. R., ARGENTON, M., ZHANG, J., ETHIRAJAN, P. L., BURDGE, G. C., BATEMAN, A. C., CLOUGH, G. F., POSTON, L., HANSON, M. A., MCCONNELL, J. M. & BYRNE, C. D. 2009. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology*, 50, 1796-808.
- CAPOBIANCO, E., WHITE, V., HIGA, R., MARTINEZ, N. & JAWERBAUM, A. 2008. Effects of natural ligands of PPARgamma on lipid metabolism in placental tissues from healthy and diabetic rats. *Mol Hum Reprod*, 14, 491-9.
- CARPENTER, K. C., STROHACKER, K. & MCFARLIN, B. K. 2013. Considerations to maximize fat mass gain in a mouse model of diet-induced weight gain. *Lab Anim*, 47, 266-73.



- CATALANO, P. M., PRESLEY, L., MINIUM, J. & HAUGUEL-DE MOUZON, S. 2009. Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. *Diabetes Care*, 32, 1076-80.
- CRUNK, A. E., MONKS, J., MURAKAMI, A., JACKMAN, M., MACLEAN, P. S., LADINSKY, M., BALES, E. S., CAIN, S., ORLICKY, D. J. & MCMANAMAN, J. L. 2013. Dynamic regulation of hepatic lipid droplet properties by diet. *PLoS One*, 8, e67631.
- CUSI, K. 2012. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*, 142, 711-725 e6.
- DAHLHOFF, M., PFISTER, S., BLUTKE, A., ROZMAN, J., KLINGENSPOR, M., DEUTSCH, M. J., RATHKOLB, B., FINK, B., GIMPFL, M., HRABE DE ANGELIS, M., ROSCHER, A. A., WOLF, E. & ENSENAUER, R. 2014. Peri-conceptional obesogenic exposure induces sex-specific programming of disease susceptibilities in adult mouse offspring. *Biochim Biophys Acta*, 1842, 304-17.
- DAVENPORT, M. H. & CABRERO, M. R. 2009. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol*, 587, 3423-4.
- DEMARQUOY, J. & LE BORGNE, F. 2015. Crosstalk between mitochondria and peroxisomes. *World J Biol Chem*, 6, 301-9.
- DIAZ, P., HARRIS, J., ROSARIO, F. J., POWELL, T. L. & JANSSON, T. 2015. Increased placental fatty acid transporter 6 and binding protein 3 expression and fetal liver lipid accumulation in a mouse model of obesity in pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 309, R1569-77.
- DRAKE, A. J. & SECKL, J. R. 2011. Transmission of programming effects across generations. *Pediatr Endocrinol Rev*, 9, 566-78.
- ESPOSITO, K., CIARDIELLO, F. & GIUGLIANO, D. 2014. Unhealthy diets: a common soil for the association of metabolic syndrome and cancer. *Endocrine*, 46, 39-42.
- FEDERICI, M., HRIBAL, M., PEREGO, L., RANALLI, M., CARADONNA, Z., PEREGO, C., USELLINI, L., NANO, R., BONINI, P., BERTUZZI, F., MARLIER, L. N., DAVALLI, A. M., CARANDENTE, O., PONTIROLI, A. E., MELINO, G., MARCHETTI, P., LAURO, R., SESTI, G. & FOLLI, F. 2001. High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes*, 50, 1290-301.
- FEREZOU-VIALA, J., ROY, A. F., SEROUGNE, C., GRIPOIS, D., PARQUET, M., BAILLEUX, V., GERTLER, A., DELPLANQUE, B., DJIANE, J., RIOTTOT, M. & TAOUIS, M. 2007. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293, R1056-62.
- FERNANDEZ-SANCHEZ, A., MADRIGAL-SANTILLAN, E., BAUTISTA, M., ESQUIVEL-SOTO, J., MORALES-GONZALEZ, A., ESQUIVEL-CHIRINO, C., DURANTE-MONTIEL, I., SANCHEZ-RIVERA, G., VALADEZ-VEGA, C. & MORALES-GONZALEZ, J. A. 2011. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*, 12, 3117-32.
- FRIEDMAN, J. M. 2004. Modern science versus the stigma of obesity. *Nat Med*, 10, 563-9.
- FRUCHART, J. C., STAELS, B. & DURIEZ, P. 2001. The role of fibric acids in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 3, 83-92.
- GAILLARD, R., DURMUS, B., HOFMAN, A., MACKENBACH, J. P., STEEGERS, E. A. & JADDOE, V. W. 2013. Risk factors and outcomes of maternal obesity and excessive weight gain during pregnancy. *Obesity (Silver Spring)*, 21, 1046-55.
- GHIBAUDI, L., COOK, J., FARLEY, C., VAN HECK, M. & HWA, J. J. 2002. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obes Res*, 10, 956-63.
- GIL HERNÁNDEZ, Á. 2010a. *Tratado de Nutrición, Tomo 1: Bases Fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*.
- GIL HERNÁNDEZ, Á. 2010b. *Tratado de Nutrición, Tomo 3: Nutrición Humana en el Estado de Salud*.

- GIL HERNÁNDEZ, Á. 2010c. *Tratado de Nutrición, Tomo 4: Nutrición Clínica*.
- GREGORIO, B. M., SOUZA-MELLO, V., CARVALHO, J. J., MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. & AGUILA, M. B. 2010. Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. *Am J Obstet Gynecol*, 203, 495 e1-8.
- GRYGIEL-GÓRNIK, B. 2014. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutrition Journal*, 10.
- GUILHERME, A., VIRBASIU, J. V., PURI, V. & CZECH, M. P. 2008. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 367-77.
- GUO, S. 2014. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol*, 220, T1-T23.
- HARROLD, J. A., DOVEY, T. M., BLUNDELL, J. E. & HALFORD, J. C. 2012. CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology*, 63, 3-17.
- HEINDEL, J. J., BLUMBERG, B., CAVE, M., MACHTINGER, R., MANTOVANI, A., MENDEZ, M. A., NADAL, A., PALANZA, P., PANZICA, G., SARGIS, R., VANDENBERG, L. N. & VOM SAAL, F. 2017. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reprod Toxicol*, 68, 3-33.
- HERRERA, E., AMUSQUIVAR, E., LOPEZ-SOLDADO, I. & ORTEGA, H. 2006. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res*, 65 Suppl 3, 59-64.
- HUANG, C. & FRETTER, C. 2015. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int J Mol Sci*, 16, 924-49.
- HUGHES, A. N. & OXFORD, J. T. 2014. A lipid-rich gestational diet predisposes offspring to nonalcoholic fatty liver disease: a potential sequence of events. *Hepat Med*, 6, 15-23.
- HUSSAIN, M. M. 2014. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol*, 25, 200-6.
- JANG, H. H., PARK, M. Y., KIM, H. W., LEE, Y. M., HWANG, K. A., PARK, J. H., PARK, D. S. & KWON, O. 2012. Black rice (*Oryza sativa* L.) extract attenuates hepatic steatosis in C57BL/6 J mice fed a high-fat diet via fatty acid oxidation. *Nutr Metab (Lond)*, 9, 27.
- JANSSEN, A. W. F., BETZEL, B., STOOPEN, G., BERENDS, F. J., JANSSEN, I. M., PEIJNENBURG, A. A. & KERSTEN, S. 2015. The impact of PPAR $\alpha$  activation on whole genome gene expression in human precision cut liver slices. *BMC Genomics*, 13.
- JAWERBAUM, A. & WHITE, V. 2017. Review on intrauterine programming: Consequences in rodent models of mild diabetes and mild fat overfeeding are not mild. *Placenta*, 52, 21-32.
- KALUPAHANA, N. S., MOUSTAID-MOUSSA, N. & CLAYCOMBE, K. J. 2012. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med*, 33, 26-34.
- KAZANTZIS, M. & STAHL, A. 2012. Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1821, 852-7.
- KERSTEN, S., SEYDOUX, J., PETERS, J. M., GONZALEZ, F. J., DESVERGNE, B. & WAHLI, W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*, 103, 1489-98.
- KHOR, V. K., SHEN, W. J. & KRAEMER, F. B. 2013. Lipid droplet metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 16, 632-7.
- KURTZ, M., CAPOBIANCO, E., MARTINEZ, N., FERNANDEZ, J., HIGA, R., WHITE, V. & JAWERBAUM, A. 2010. Carbaprostacyclin, a PPAR $\delta$  agonist, ameliorates excess lipid accumulation in diabetic rat placentas. *Life Sci*, 86, 781-90.
- LEE, Y., YU, X., GONZALES, F., MANGELSDORF, D. J., WANG, M. Y., RICHARDSON, C., WITTERS, L. A. & UNGER, R. H. 2002. PPAR alpha is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11848-53.

- LEWIS, G. F. 1997. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol*, 8, 146-53.
- LEWIS, G. F., CARPENTIER, A., ADELI, K. & GIACCA, A. 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev*, 23, 201-29.
- LI, M., REYNOLDS, C. M., SEGOVIA, S. A., GRAY, C. & VICKERS, M. H. 2015. Developmental Programming of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Effect of Early Life Nutrition on Susceptibility and Disease Severity in Later Life. *Biomed Res Int*, 2015, 437107.
- LIANG, C., DECOURCY, K. & PRATER, M. R. 2010. High-saturated-fat diet induces gestational diabetes and placental vasculopathy in C57BL/6 mice. *Metabolism*, 59, 943-50.
- LIU, H., ZHANG, H., CUI, R., GUO, X., WANG, D. & DAI, J. 2016. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha ameliorates perfluorododecanoic acid-induced production of reactive oxygen species in rat liver. *Arch Toxicol*, 90, 1383-97.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LODHI, I. J. & SEMENKOVICH, C. F. 2014. Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling. *Cell Metab*, 19, 380-92.
- LUCERO, D., MIKSZTOWICZ, V., MACRI, V., LOPEZ, G. H., FRIEDMAN, S., BERG, G., ZAGO, V. & SCHREIER, L. 2015. Overproduction of altered VLDL in an insulin-resistance rat model: Influence of SREBP-1c and PPAR-alpha. *Clin Investig Arterioscler*, 27, 167-74.
- MAGLIANO, D. C., BARGUT, T. C., DE CARVALHO, S. N., AGUILA, M. B., MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. & SOUZA-MELLO, V. 2013. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma are targets to treat offspring from maternal diet-induced obesity in mice. *PLoS One*, 8, e64258.
- MALARKEY, D. E., JOHNSON, K., RYAN, L., BOORMAN, G. & MARONPOT, R. R. 2005. New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol*, 33, 27-34.
- MANNAERTS, G. P., VAN VELDHOVEN, P. P. & CASTEELS, M. 2000. Peroxisomal lipid degradation via beta- and alpha-oxidation in mammals. *Cell Biochem Biophys*, 32 Spring, 73-87.
- MARSEGLIA, L., MANTI, S., D'ANGELO, G., NICOTERA, A., PARISI, E., DI ROSA, G., GITTO, E. & ARRIGO, T. 2014. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int J Mol Sci*, 16, 378-400.
- MARTINEZ, N., CAPOBIANCO, E., WHITE, V., PUSTOVRH, M. C., HIGA, R. & JAWERBAUM, A. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation regulates lipid metabolism in the fetoplacental unit from diabetic rats. *Reproduction*, 136, 95-103.
- MARTINEZ, N., KURTZ, M., CAPOBIANCO, E., HIGA, R., WHITE, V. & JAWERBAUM, A. 2011a. PPARalpha agonists regulate lipid metabolism and nitric oxide production and prevent placental overgrowth in term placentas from diabetic rats. *J Mol Endocrinol*, 47, 1-12.
- MARTINEZ, N., WHITE, V., KURTZ, M., HIGA, R., CAPOBIANCO, E. & JAWERBAUM, A. 2011b. Activation of the nuclear receptor PPARalpha regulates lipid metabolism in foetal liver from diabetic rats: implications in diabetes-induced foetal overgrowth. *Diabetes Metab Res Rev*, 27, 35-46.
- MASHEK, D. G. 2013. Hepatic fatty acid trafficking: multiple forks in the road. *Adv Nutr*, 4, 697-710.
- MAZZUCCO, M. B. 2016. *El incremento de la ingesta materna de grasas saturadas programa alteraciones hepáticas en la descendencia de rata: rol de la desregularización en el accionar de leptina*. Universidad de Buenos Aires.
- MAZZUCCO, M. B., FORNES, D., CAPOBIANCO, E., HIGA, R., JAWERBAUM, A. & WHITE, V. 2016. Maternal saturated-fat-rich diet promotes leptin resistance in fetal liver lipid catabolism and programs lipid homeostasis impairments in the liver of rat offspring. *J Nutr Biochem*, 27, 61-9.

- MAZZUCCO, M. B., HIGA, R., CAPOBIANCO, E., KURTZ, M., JAWERBAUM, A. & WHITE, V. 2013. Saturated fat-rich diet increases fetal lipids and modulates LPL and leptin receptor expression in rat placentas. *J Endocrinol*, 217, 303-15.
- MCGARRY, J. D., MANNAERTS, G. P. & FOSTER, D. W. 1977. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest*, 60, 265-70.
- MCMANAMAN, J. L., BALES, E. S., ORLICKY, D. J., JACKMAN, M., MACLEAN, P. S., CAIN, S., CRUNK, A. E., MANSUR, A., GRAHAM, C. E., BOWMAN, T. A. & GREENBERG, A. S. 2013. Perilipin-2-null mice are protected against diet-induced obesity, adipose inflammation, and fatty liver disease. *J Lipid Res*, 54, 1346-59.
- MCMULLEN, P. D., BHATTACHARYA, S., WOODS, C. G., SUN, B., YARBOROUGH, K., ROSS, S. M., MILLER, M. E., MCBRIDE, M. T., LECLUYSE, E. L., CLEWELL, R. A. & ANDERSEN, M. E. 2014. A map of the PPARalpha transcription regulatory network for primary human hepatocytes. *Chem Biol Interact*, 209, 14-24.
- MEI, L., TANG, Y., LI, M., YANG, P., LIU, Z., YUAN, J. & ZHENG, P. 2015. Co-Administration of Cholesterol-Lowering Probiotics and Anthraquinone from *Cassia obtusifolia* L. Ameliorate Non-Alcoholic Fatty Liver. *PLoS One*, 10, e0138078.
- MENDEZ-SANCHEZ, N., CRUZ-RAMON, V. C., RAMIREZ-PEREZ, O. L., HWANG, J. P., BARRANCO-FRAGOSO, B. & CORDOVA-GALLARDO, J. 2018. New Aspects of Lipotoxicity in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Int J Mol Sci*, 19.
- MOTA, M., BANINI, B. A., CAZANAVE, S. C. & SANYAL, A. J. 2016. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, 65, 1049-61.
- NGUYEN, P., LERAY, V., DIEZ, M., SERISIER, S., LE BLOC'H, J., SILIART, B. & DUMON, H. 2008. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 92, 272-83.
- NICULESCU, M. D. & LUPU, D. S. 2009. High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci*, 27, 627-33.
- ODEGAARD, J. I. & CHAWLA, A. 2011. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol*, 6, 275-97.
- ONAL, G., KUTLU, O., GOZUACIK, D. & DOKMECI EMRE, S. 2017. Lipid Droplets in Health and Disease. *Lipids Health Dis*, 16, 128.
- PAWELLA, L. M., HASHANI, M., EITENEUER, E., RENNER, M., BARTENSCHLAGER, R., SCHIRMACHER, P. & STRAUB, B. K. 2014. Perilipin discerns chronic from acute hepatocellular steatosis. *J Hepatol*, 60, 633-42.
- PREIDIS, G. A., KIM, K. H. & MOORE, D. D. 2017. Nutrient-sensing nuclear receptors PPARalpha and FXR control liver energy balance. *J Clin Invest*, 127, 1193-1201.
- PYPER, S. R., VISWAKARMA, N., YU, S. & REDDY, J. K. 2010. PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nucl Recept Signal*, 8, e002.
- REYNOLDS, C. M., VICKERS, M. H., HARRISON, C. J., SEGOVIA, S. A. & GRAY, C. 2015. Maternal high fat and/or salt consumption induces sex-specific inflammatory and nutrient transport in the rat placenta. *Physiol Rep*, 3.
- RICCARDI, G., GIACCO, R. & RIVELLESE, A. A. 2004. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr*, 23, 447-56.
- ROBERTS, D. L., DIVE, C. & RENEHAN, A. G. 2010. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives. *Annu Rev Med*, 61, 301-16.
- RUI, L. 2014. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*, 4, 177-97.
- SAHINI, N. & BORLAK, J. 2016. Genomics of human fatty liver disease reveal mechanistically linked lipid droplet-associated gene regulations in bland steatosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Transl Res*, 177, 41-69.

- SCHAIFF, W. T., CARLSON, M. G., SMITH, S. D., LEVY, R., NELSON, D. M. & SADOVSKY, Y. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 3874-81.
- SEGOVIA, S. A., VICKERS, M. H., GRAY, C. & REYNOLDS, C. M. 2014. Maternal obesity, inflammation, and developmental programming. *Biomed Res Int*, 2014, 418975.
- SHANKAR, K., HARRELL, A., LIU, X., GILCHRIST, J. M., RONIS, M. J. & BADGER, T. M. 2008. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294, R528-38.
- SILVA, A. K. S. & PEIXOTO, C. A. 2018. Role of peroxisome proliferator-activated receptors in non-alcoholic fatty liver disease inflammation. *Cell Mol Life Sci*, 75, 2951-2961.
- SINGHAL, S. S., SINGH, S. P., SINGHAL, P., HORNE, D., SINGHAL, J. & AWASTHI, S. 2015. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicol Appl Pharmacol*, 289, 361-70.
- STEFANOVIC-RACIC, M., PERDOMO, G., MANTELL, B. S., SIPULA, I. J., BROWN, N. F. & O'DOHERTY, R. M. 2008. A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294, E969-77.
- STORCH, J. & CORSICO, B. 2008. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu Rev Nutr*, 28, 73-95.
- STOREY, S. M., MCINTOSH, A. L., HUANG, H., MARTIN, G. G., LANDROCK, K. K., LANDROCK, D., PAYNE, H. R., KIER, A. B. & SCHROEDER, F. 2012. Loss of intracellular lipid binding proteins differentially impacts saturated fatty acid uptake and nuclear targeting in mouse hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 303, G837-50.
- SZTALRYD, C. & KIMMEL, A. R. 2014. Perilipins: lipid droplet coat proteins adapted for tissue-specific energy storage and utilization, and lipid cytoprotection. *Biochimie*, 96, 96-101.
- TAMURA, K., ONO, A., MIYAGISHIMA, T., NAGAO, T. & URUSHIDANI, T. 2006. Profiling of gene expression in rat liver and rat primary cultured hepatocytes treated with peroxisome proliferators. *J Toxicol Sci*, 31, 471-90.
- TANIGUCHI, A., FUKUSHIMA, M., SAKAI, M., TOKUYAMA, K., NAGATA, I., FUKUNAGA, A., KISHIMOTO, H., DOI, K., YAMASHITA, Y., MATSUURA, T., KITATANI, N., OKUMURA, T., NAGASAKA, S., NAKAISHI, S. & NAKAI, Y. 2001. Effects of bezafibrate on insulin sensitivity and insulin secretion in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. *Metabolism*, 50, 477-80.
- TONTONOZ, P. & SPIEGELMAN, B. M. 2008. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem*, 77, 289-312.
- TRAYHURN, P. 2013. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev*, 93, 1-21.
- TREVINO, L. S., WANG, Q. & WALKER, C. L. 2015. Phosphorylation of epigenetic "readers, writers and erasers": Implications for developmental reprogramming and the epigenetic basis for health and disease. *Prog Biophys Mol Biol*, 118, 8-13.
- TROVATO, F. M., CATALANO, D., MUSUMECI, G. & TROVATO, G. M. 2014. 4Ps medicine of the fatty liver: the research model of predictive, preventive, personalized and participatory medicine--recommendations for facing obesity, fatty liver and fibrosis epidemics. *EPMA J*, 5, 21.
- VICKERS, M. H. 2014. Developmental programming and transgenerational transmission of obesity. *Ann Nutr Metab*, 64 Suppl 1, 26-34.
- VIRTUE, S. & VIDAL-PUIG, A. 2010. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta*, 1801, 338-49.
- WANG, Y. X. 2010. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell Res*, 20, 124-37.



- WEIN, S., UKROPEC, J., GASPERIKOVA, D., KLIMES, I. & SEBOKOVA, E. 2007. Concerted action of leptin in regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle and liver. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 115, 244-51.
- YI, X., CAO, S., CHANG, B., ZHAO, D., GAO, H., WAN, Y., SHI, J., WEI, W. & GUAN, Y. 2013. Effects of acute exercise and chronic exercise on the liver leptin-AMPK-ACC signaling pathway in rats with type 2 diabetes. *J Diabetes Res*, 2013, 946432.
- ZHOU, D. & PAN, Y. X. 2015. Pathophysiological basis for compromised health beyond generations: role of maternal high-fat diet and low-grade chronic inflammation. *J Nutr Biochem*, 26, 1-8.
- ZHU, M. J., MA, Y., LONG, N. M., DU, M. & FORD, S. P. 2010. Maternal obesity markedly increases placental fatty acid transporter expression and fetal blood triglycerides at midgestation in the ewe. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 299, R1224-31.