



Efecto de la sobrenutrición neonatal en la respuesta aguda a la leptina en los periodos prepuberal y peripuberal

Memoria para optar al grado de Doctor del Licenciado

D. David Castro González

Director

Prof. Dr. Jesús Argente Oliver

Madrid, 2014



Prof. Dr. D. Jesús Argente Oliver, Catedrático de Pediatría de la Universidad Autónoma de Madrid, Director del Departamento de Pediatría y Jefe de Servicio de Endocrinología del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús,

CERTIFICA

Que **D. David Castro González**, Licenciado en Biología por la Universidad de León, ha realizado bajo su dirección en el Laboratorio de Investigación del Servicio de Endocrinología del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, el trabajo de investigación titulado **“Efecto de la sobrenutrición neonatal en la respuesta aguda a la leptina en los periodos prepuberal y peripuberal”**, para optar al grado de Doctor.

La revisión doctrinal, el diseño metodológico y el volumen extraordinario de resultados obtenidos, así como la excelente calidad de la discusión efectuada y el rigor de la bibliografía empleada, han aportado datos relevantes para la comunidad científica, abriendo nuevas líneas de investigación que, con absoluta seguridad, tendrán continuidad.

D. David Castro González ha efectuado un trabajo impecable, participando de forma activa en cuantos análisis, comentarios, sugerencias y acciones se han derivado de la obtención de los resultados.

Por lo expuesto anteriormente, considero que dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para ser sometido a lectura y defensa ante el tribunal pertinente.

En Madrid, a 13 de enero de dos mil catorce

**Fdo.: Prof. Dr. D. Jesús Argente Oliver
Director de la Tesis Doctoral**



Este trabajo ha sido realizado con cargo a proyectos del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto Carlos III (PI10/00747) y del CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB06/03).

David Castro González ha recibido financiación del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto Carlos III (PI10/00747).

Resumen

Las condiciones nutricionales en el periodo neonatal pueden producir efectos que persisten o se ven acentuados en etapas posteriores de la vida. Diferentes estudios han comprobado que la sobrenutrición en esta etapa del desarrollo provoca alteraciones en los mecanismos metabólicos y neuroendocrinos que controlan el equilibrio homeostático y el comienzo de la pubertad, determinando el desarrollo de sobrepeso y el mantenimiento del mismo, y posiblemente, modificando el tiempo de entrada en pubertad. La acción que la leptina ejerce en el hipotálamo podría desempeñar una función relevante no sólo en la modulación del equilibrio homeostático, si no también como un factor permisivo en la activación del eje hipotálamo-hipófisis.

Por ello, en este trabajo se ha tratado de determinar si la sobrenutrición neonatal, con el consiguiente desarrollo de sobrepeso, modificaría la respuesta aguda a esta hormona antes del comienzo de la pubertad, y si lo haría de forma distinta en los dos sexos. Para lo cual, se desarrollaron dos modelos fisiológicos de sobrepeso mediante la manipulación del tamaño de la camada de ratas Wistar, con el fin de estudiar la señalización basal por leptina en el hipotálamo a lo largo del desarrollo postnatal y la respuesta central a un aumento agudo de esta hormona en la etapa prepuberal y cerca del comienzo de la pubertad.

Los resultados obtenidos indican que la sobrenutrición neonatal modifica la señalización basal por leptina únicamente en el hipotálamo de las hembras con sobrepeso, lo que podría estar relacionado con el dimorfismo en la alteración de las redes neuronales que controlan el equilibrio homeostático y el eje hipotálamo-hipófisis. Además, la sobrenutrición neonatal modifica la respuesta central, en los periodos pre- y peripuberal, a un aumento agudo de leptina, pero sin activar el eje hipotálamo-hipófisis. Esta respuesta es similar en ambos sexos en la etapa prepuberal, pero existe dimorfismo sexual en el periodo peripuberal, estando en las hembras relacionado con la regulación de rutas hipotalámicas, no evidenciándose tal hecho en los machos.

Es necesario seguir investigando el papel que la leptina ejerce en el comienzo de la pubertad, y en qué modo la obesidad puede influir en este proceso; pero abordando el análisis de las rutas y mecanismos neurohormonales de una manera independiente en cada uno de los sexos, para, en último término, poder desarrollar tratamientos más seguros y efectivos contra la obesidad.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico.	HOMA-IR: índice de resistencia a la insulina mediante evaluación del modelo homeostático.
AgRP: péptido relacionado con Agouti.	IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina-I.
Akt: proteína quinasa específica de serina/treonina.	IMC: índice de masa corporal.
ANOVA: análisis de la varianza.	IP: intraperitoneal.
ARNm: ácido ribonucleico mensajero.	IRS: receptor de insulina.
ATP: adenosina trifosfato.	JAK-2: Janus quinasa 2.
BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro.	Kiss: kisspeptina.
BIOPLEX: inmunoensayo múltiple en suspensión.	KissR: receptor de kisspeptina.
CART: transcrito regulado por cocaína y anfetamina.	Kg: kilogramos.
CCK: colecistoquinina.	L: litro.
c-Fos: proteína del proto-oncogén homólogo humano del oncogén retroviral v-fos.	LepR: receptor de leptina.
CM: crías por madre.	LH: hormona luteinizante.
cm: centímetros.	M: molar.
dL: decilitros.	mA: miliamperios.
EDTA: ácido tilendiaminotetraacético.	MCH: hormona concentradora de melanina.
ERK: quinasa relacionada con señal extracelular.	MCR: receptores de melanocortina.
FOXO-1: factor de transcripción 1 con dominio de unión en cabeza de tenedor.	mg: miligramos.
FSH: hormona folículo estimulante.	mL: mililitros.
g: gramos.	mmol: milimoles.
GABA: ácido gamma amino butírico.	mTOR: diana de la rapamicina en mamíferos.
GFAP: proteína ácida fibrilar glial.	mU: miliunidades.
GH: hormona del crecimiento.	ng: nanogramos.
GLP: péptido similar al glucagón.	NPY: neuropéptido Y.
GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas.	ob/ob: genotipo mutante obeso.
Gpr54: receptor huérfano acoplado a proteínas G.	OMS: Organización Mundial de la Salud.
Grb2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico.	p-: proteína fosforilada.
	PAGE: gel de poliacrilamida.
	PBT: tampón fosfato salino.
	pg: picogramos.
	PI3K: fosfoinositol 3-quinasa.
	PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
	POMC: pro-opiomelanocortina.

PPAR: receptor activado por proliferador de peroxisomas.

PTEN: homólogo de la fosfatasa y la tensina.

PTP1B: proteína fosfatasa 1B.

PYY: péptido tirosina tirosina.

qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.

R: coeficiente de correlación de Pearson.

RIA: radioinmunoensayo.

rpm: revoluciones por minuto.

SDS: dodecil sulfato sódico.

Ser: serina.

Shc: proteína adaptadora de la señalización.

sLepR: isoforma soluble del receptor de leptina.

SNC: sistema nervioso central.

SOCS3: supresor de la señalización por citoquinas 3.

Sos: factor intercambiador de nucleótidos de guanina.

SREBP: proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides.

Src: tirosina quinasa.

STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3.

TSH: hormona estimulante de la tiroides.

Tyr: tirosina.

V: voltios.

v/v: volumen por volumen.

w/v: peso por volumen.

xg: campo centrífugo aplicado (cm/seg^2).

°C: grados centígrados.

µg: microgramos.

µL: microlitros.

Índice

I. Introducción	1
1. Obesidad: la epidemia del siglo XXI.....	3
2. Nutrición perinatal y dieta: influencia sobre la obesidad.....	4
3. Control del equilibrio homeostático: papel de las hormonas gastrointestinales y del tejido adiposo.....	6
3.1. Hipotálamo: integración de las señales periféricas moduladoras de la homeostasis.....	6
3.2. Hormonas gastrointestinales.....	11
A) Polipéptidos pancreáticos y péptidos derivados del glucagón.....	11
B) Ghrelina y obestatina.....	12
C) Colecistoquinina y amilina.....	14
3.3. Tejido adiposo.....	15
3.3.1. Leptina: implicaciones fisiológicas en la homeostasis y la pubertad.....	16
A) Señalización intracelular por leptina.....	17
B) Papel de la leptina en el crecimiento y el desarrollo.....	19
C) Relación entre la obesidad y la pubertad: posible rol de la leptina.....	20
4. Hipótesis.....	27
5. Objetivos.....	28
II. Material y métodos	29
1. Modelos experimentales.....	31
1.1. Modelo de sobrepeso prepuberal con administración aguda de leptina.....	31
1.2. Modelo de sobrepeso durante el desarrollo.....	32
2. Técnicas analíticas.....	33
2.1. Inmunoensayo múltiple en suspensión.....	35
2.2. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.....	36
2.3. Radioinmunoensayo.....	37
2.4. Western blotting.....	37
2.5. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.....	40
3. Análisis estadístico.....	42
III. Resultados	45
1. Sobrepeso durante el desarrollo.....	47
1.1. Efecto de la sobrenutrición neonatal sobre los parámetros morfológicos y la ingesta.....	47
1.2. Efecto de la sobrenutrición neonatal y el consiguiente desarrollo de sobrepeso sobre la glucemia y los niveles hormonales circulantes.....	52

1.3. Efecto de la sobrenutrición neonatal y el consiguiente desarrollo de sobrepeso sobre las proteínas STAT3 y SOCS3 en el hipotálamo.....	56
1.4. Efecto de la sobrenutrición neonatal y el consiguiente desarrollo de sobrepeso sobre la expresión génica en la hipófisis.....	58
1.5. Resumen de los efectos de la sobrenutrición neonatal en el modelo de sobrepeso durante el desarrollo.....	61
2. Administración aguda de leptina en animales con sobrepeso prepuberal.....	63
2.1. Efecto de la sobrenutrición neonatal sobre los parámetros morfológicos y la ingesta.....	63
A) Día 21 – Machos y hembras.....	63
B) Día 30 – Hembras.....	66
C) Día 35 – Machos.....	68
2.2. Efecto del tratamiento agudo con leptina sobre los niveles hormonales circulantes y la señalización intracelular de la misma en el hipotálamo.....	71
A) Día 21 – Machos y hembras – Leptina 45 minutos.....	71
A.1) Día 21 – Machos.....	74
A.2) Día 21 – Hembras.....	77
B) Día 30 – Hembras – Leptina 45 minutos y 2 horas.....	79
B.1) Día 30 – Hembras – Leptina 45 minutos.....	81
B.2) Día 30 – Hembras – Leptina 2 horas.....	84
C) Día 35 – Machos – Leptina 45 minutos y 2 horas.....	87
C.1) Día 35 – Machos – Leptina 45 minutos.....	89
C.2) Día 35 – Machos – Leptina 2 horas.....	90
2.3. Efecto del tratamiento agudo con leptina sobre la expresión génica en el hipotálamo....	92
A) Día 30 – Hembras – Leptina 2 horas.....	92
B) Día 35 – Machos – Leptina 2 horas.....	94
2.4. Efecto del tratamiento agudo con leptina sobre la expresión génica en la hipófisis.....	95
A) Día 30 – Hembras – Leptina 2 horas.....	95
B) Día 35 – Machos – Leptina 2 horas.....	96
2.5. Resumen de los efectos de la sobrenutrición neonatal y de la administración aguda de leptina en los animales del modelo de sobrepeso prepuberal.....	97
IV. Discusión.....	101
1. Consideraciones sobre los modelos experimentales.....	103
2. Cambios durante el desarrollo.....	103
2.1. Composición corporal y cambios hormonales.....	104
2.1.1. Efecto del sobrepeso.....	108

2.2. Plasticidad neuroglial y pubertad.....	111
2.2.1. Efecto del sobrepeso.....	114
2.3. Señalización por leptina en el hipotálamo.....	115
2.3.1. Efecto del sobrepeso.....	118
3. Respuesta a la administración aguda de leptina.....	119
3.1. Etapa prepuberal: señalización en el hipotálamo.....	120
3.1.1. Efecto del sobrepeso.....	120
3.2. Etapa peripuberal.....	122
3.2.1. Señalización en el hipotálamo y activación del eje reproductivo.....	122
A) Hembras.....	122
A.1) Efecto del sobrepeso.....	123
B) Machos.....	126
B.1) Efecto del sobrepeso.....	126
3.2.2. Factor neurotrófico derivado del cerebro: posible papel en la obesidad y en la pubertad a través de la leptina.....	128
A) Hembras.....	129
B) Machos.....	129
4. Consideraciones finales.....	130
V. Conclusiones.....	133
VI. Referencias bibliográficas.....	137

I. Introducción

1. Obesidad: la epidemia del siglo XXI

La obesidad y/o el sobrepeso se definen, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), como una acumulación anormal o excesiva de grasa en el organismo que puede ser perjudicial para la salud, y que se manifiesta por un exceso de peso y volumen corporales [1]. Esta acumulación anormal de grasa es consecuencia de un balance positivo, a lo largo del tiempo, entre el consumo calórico y el gasto energético [2], cuya causa puede deberse a factores de diferente índole; esto es: genéticos, hormonales, nutricionales, ambientales o psicosociales [3-5]. Para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos se utiliza, frecuentemente, el índice de masa corporal (IMC). Este índice es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla, que se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros. Un IMC igual o superior a 25 determinaría sobrepeso, mientras que un IMC igual o superior a 30 determinaría obesidad. En el caso de los niños y adolescentes, la obesidad se determina en función del IMC expresado en percentiles o desviaciones estándar (DE). A pesar de no existir un acuerdo internacional al respecto, puede considerarse que un IMC superior al percentil P97 o superior a +2DE es indicativo de obesidad [6].

Según datos de la OMS, en el año 2008 había en todo el mundo alrededor de 1.400 millones de personas mayores de 20 años con sobrepeso, de las cuales más de 200 millones de hombres y cerca de 300 millones de mujeres eran obesos. Además, en el año 2010 aproximadamente 42 millones de niños menores de 5 años tenían sobrepeso. Las estimaciones de este organismo indican que en el año 2015 habrá, aproximadamente, 2.300 millones de personas adultas con sobrepeso y más de 700 millones con obesidad [1]. En relación con estos datos, diferentes estudios han confirmado el incremento gradual de la prevalencia de la obesidad y el sobrepeso en las últimas décadas a nivel mundial [7], con una especial significación en el caso de la población infantil y juvenil, donde la evolución de esta prevalencia sigue una tendencia parecida tanto en los países desarrollados [8, 9] como en los que están en vías de desarrollo [10]. Este aumento alarmante de la obesidad y el sobrepeso se ha traducido en un gran impacto sobre la morbimorbilidad, la calidad de vida y el gasto sanitario [1, 11, 12], por lo que se ha dado en considerar a la obesidad como una epidemia en toda regla.

En sí misma, la obesidad se considera como una enfermedad crónica, cuyo desarrollo en etapas infantojuveniles está asociado con una mayor persistencia de la misma en la edad adulta [13-16]; pero también se considera como un importante factor de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades en el adulto, tales como diabetes tipo 2, hipertensión arterial, dislipemias, cardiopatía isquémica, alteraciones osteoarticulares, insuficiencia venosa

y accidentes cerebrovasculares entre otras [17]. Como consecuencia, el incremento de la prevalencia de la obesidad tiene una relación directa con el elevado y gradual aumento del coste económico derivado del tratamiento de las enfermedades asociadas a ésta. A modo de ejemplo, los costes directos del tratamiento de la obesidad y sus patologías asociadas en los Estados Unidos en el año 1999 constituyeron el 7% del gasto sanitario total. En Europa (Reino Unido, Francia, Alemania, Portugal y Países Bajos), estos costes oscilan entre el 1,5 y el 4%, probablemente debido a que la prevalencia de la obesidad en Europa es inferior a la estadounidense [18]. En España, se estima que los costes asociados con la obesidad representan un 7% del gasto sanitario a fecha de 2007, lo que supone unos 2.500 millones de euros anuales [19]. Al mismo tiempo, los niños y adolescentes con obesidad presentan una mayor utilización de los servicios sanitarios en comparación con los niños con peso normal [20], llevando, por ejemplo, en Estados Unidos a un incremento en el gasto sanitario hospitalario achacable al tratamiento de enfermedades de los niños con obesidad, de cerca de 100 millones de dólares en el periodo 1997-1999 respecto del periodo 1979-1981 [21].

Por todo ello, la prevención y el tratamiento de la obesidad infantil y juvenil es una cuestión prioritaria, que requiere la implicación institucional de los gobiernos de los países afectados por esta enfermedad, fomentando conductas saludables como una dieta equilibrada y la realización de ejercicio físico [19, 22], además de impulsando la investigación sobre los diferentes mecanismos moleculares y fisiológicos implicados en el desarrollo de la obesidad, con el fin de poder desarrollar tratamientos más seguros y efectivos.

2. Nutrición perinatal y dieta: influencia sobre la obesidad

La denominada “hipótesis Barker” [23, 24], según la cual la adiposidad abdominal, las enfermedades coronarias y otros factores asociados al síndrome metabólico podrían tener lugar como resultado de una nutrición materna insuficiente durante la gestación, puso de manifiesto la importancia que la nutrición perinatal tendría durante el crecimiento y el desarrollo. Los estudios epidemiológicos y experimentales demuestran que cualquier estímulo que se produzca durante el desarrollo genera una respuesta fisiológica permanente [25]. Por ello, las condiciones nutricionales en las etapas fetal y neonatal temprana pueden producir efectos sobre el feto y el recién nacido que persisten o se ven acentuados en etapas posteriores de la vida [25]. Esto es así, debido a que la nutrición perinatal tiene una influencia crítica en el desarrollo y la regulación de vías y redes neuronales involucradas en el crecimiento [26].

En las mujeres sin sobrepeso u obesidad se ha comprobado que la ganancia excesiva de peso durante el embarazo aumenta el riesgo de que los hijos desarrollen obesidad [27, 28]. Está descrito en modelos animales que tanto la restricción calórica como la sobrenutrición durante la gestación predispone a las crías al desarrollo de obesidad y síndrome metabólico [29-31]. Además, se ha demostrado que el sobrepeso materno en ratas, desde el momento de la concepción hasta el nacimiento, puede inducir cambios en los niveles de insulina y adiponectina en las crías, y alterar la expresión de determinados genes implicados en el metabolismo de los carbohidratos, en la biosíntesis de lípidos y en el catabolismo de los ácidos grasos [32].

El síndrome metabólico, generado por las alteraciones provocadas a causa de una nutrición postnatal excesiva, se define como la combinación, en un individuo, de una serie de anomalías (hipertensión arterial, adiposidad central, bajos niveles séricos de colesterol HDL, concentraciones séricas de triglicéridos elevadas e hiperglucemia en ayuno) que incrementan la probabilidad de padecer una enfermedad cardiovascular o diabetes mellitus [34]. Diferentes estudios también incluyen a factores causantes de inflamación, al estrés oxidativo, a la resistencia a la leptina y a la activación de las células endoteliales, como característicos del síndrome metabólico [34-36].

Existen evidencias que sugieren que las respuestas a los cambios tempranos inducidos por la nutrición perinatal son diferentes en ambos sexos [37-39]. Sin embargo, la mayoría de los estudios publicados no evalúan de forma comparativa las respuestas diferenciales, centrándose únicamente en un sexo. Muchos de estos estudios se llevan a cabo mediante la manipulación del tamaño de la camada durante la lactancia, reduciendo o aumentando el tamaño de la misma, para regular la disponibilidad de los nutrientes procedentes de la madre [40, 41]. La reducción del tamaño de la camada se traduce en una mayor ingesta de las crías, así como un aumento del peso, no sólo durante la lactancia, sino también durante el desarrollo puberal y la edad adulta, acompañado de hiperleptinemia e hiperinsulinemia [42, 43].

El tipo de dieta ingerida puede influir de forma desigual en la ganancia o disminución de peso y en la composición corporal, debido a que las distintas proporciones y tipos de nutrientes pueden actuar de manera diferente regulando las vías metabólicas implicadas en el control homeostático [44-46]. Así pues, está bien establecido que las dietas ricas en grasas monoinsaturadas, hidratos de carbono y/o azúcares promueven la ganancia de peso corporal y favorecen la aparición de las complicaciones relacionadas con la obesidad [38, 44, 47, 48]. Por el contrario, patrones alimentarios tales como la dieta mediterránea, donde la grasa monoinsaturada se sustituye por grasas saturadas y trans, y la ingesta de frutas, vegetales,

fibra y cereales es elevada, están asociados con una disminución de peso y una tasa reducida de muerte cardíaca e infarto de miocardio [49, 50].

3. Control del equilibrio homeostático: papel de las hormonas gastrointestinales y del tejido adiposo

El conocimiento y comprensión de los mecanismos que regulan el consumo calórico y el gasto energético es un aspecto crucial para el desarrollo de tratamientos contra la obesidad. Los conocimientos actuales sobre la regulación del consumo de alimentos y el comportamiento en la elección del mismo, así como las bases fisiológicas y genéticas de las diferencias entre sexos o individuos en el gasto de energía, se deben a la combinación de los estudios clínicos y los modelos animales, siendo estos últimos de gran importancia en estudios genéticos, epigenéticos, hormonales o en respuesta a diferentes dietas, del mismo modo que en la identificación y desarrollo de diversos agentes farmacéuticos [51].

La alimentación y el gasto energético están controlados por redes neuronales complejas distribuidas a lo largo del prosencéfalo y el tronco del encéfalo. Existen diferentes regiones cerebrales relacionadas con la recompensa, como el área septal o la amígdala, que están implicadas en el control no homeostático del comportamiento alimentario [52]. Aunque existen diversas regiones cerebrales implicadas, la región nuclear diencefálica denominada hipotálamo es el área más importante en el que se integra el control homeostático de la ingesta [53-55]. Esta región se regula, directa o indirectamente, por diferentes señales periféricas de gran importancia en el mantenimiento del estatus energético. Así pues, las hormonas gastrointestinales como el péptido tirosina tirosina (PYY), el polipéptido pancreático, los péptidos derivados de proglucagón o la ghrelina están implicadas en la regulación a corto plazo de la ingestión de comida, mientras que señales de adiposidad tales como la insulina y la leptina están implicadas en el control de la homeostasis energética a corto y largo plazo [56-58].

3.1. Hipotálamo: integración de las señales periféricas moduladoras de la homeostasis

En el cerebro humano el hipotálamo está situado en el área ventral del diencefalo, por debajo del tálamo, delimitado rostralmente por la lámina terminal y caudalmente por una línea que se extiende en sentido dorsal desde la cara posterior del tubérculo mamilar hasta su intersección con el surco hipotalámico (figura 1). Esta área está conformada por diferentes núcleos neuronales, cada uno de los cuales puede estar implicado en diversas funciones, tales como la reproducción, el funcionamiento cardiovascular, las actividades viscerales motoras y sensitivas, la regulación de la temperatura corporal y la modulación de la actividad

hipofisaria; desempeñando una función relevante en la homeostasis energética los núcleos arcuato, paraventricular, ventromedial, dorsomedial y el área hipotalámica lateral [59, 60].

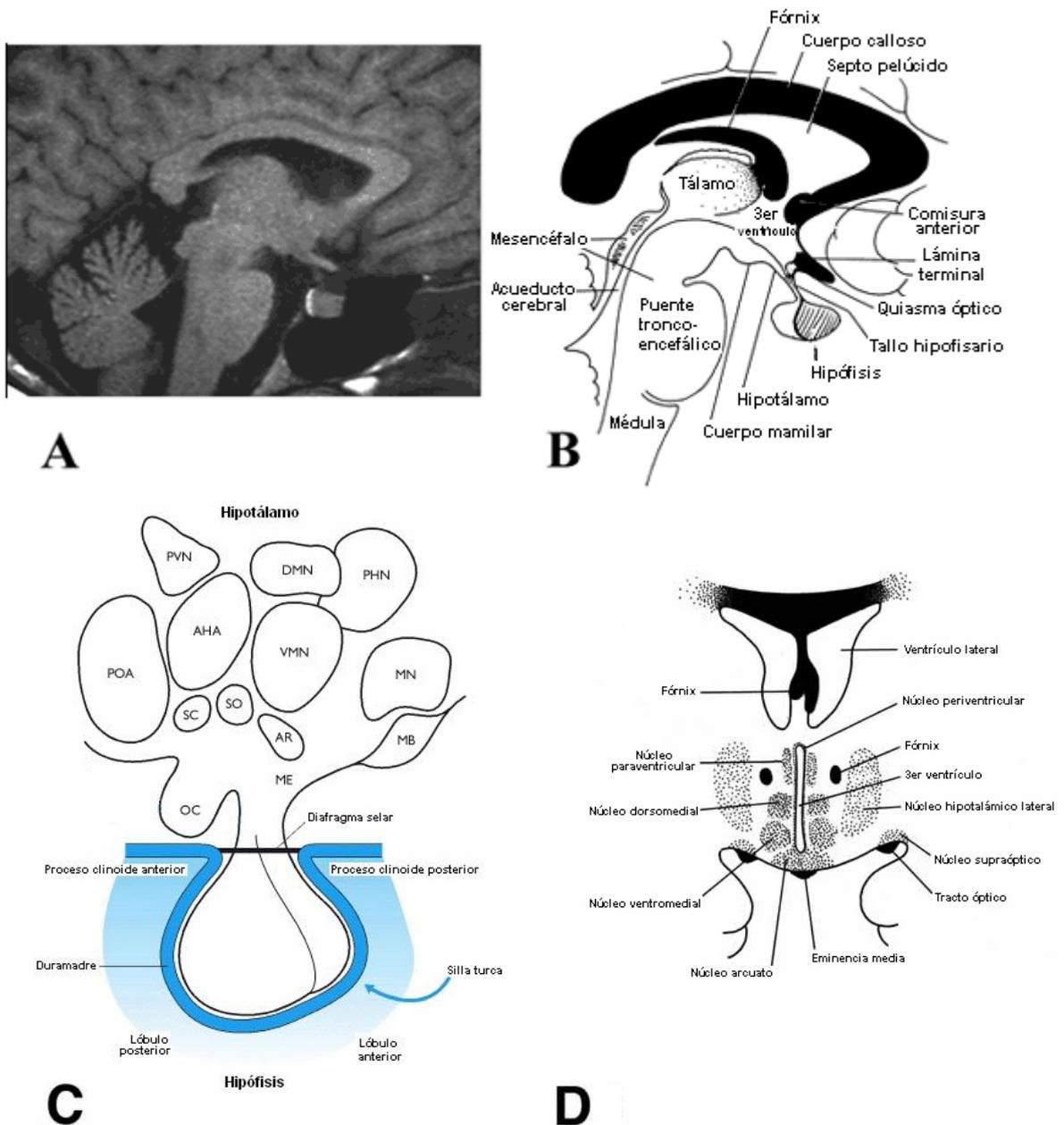


Figura 1. Anatomía del hipotálamo humano. Imagen de resonancia magnética (A) y correspondiente ilustración esquemática en orientación sagital (B) de la disposición del hipotálamo en el cerebro. Diagrama de los principales núcleos hipotalámicos y de la hipófisis (C) y representación esquemática de los mismos en orientación coronal (D). AHA: área hipotalámica anterior; AR: núcleo arcuato; DMN: núcleo dorsomedial; MB: cuerpo mamilar; ME: eminencia media; MN: núcleo medial; OC: quiasma óptico; PHN: núcleo hipotalámico posterior; POA: área preóptica; PVN: núcleo paraventricular; SC: núcleo supraquiasmático; SO: núcleo supraóptico; VMN: núcleo ventromedial.

En el núcleo arcuato se localizan dos importantes poblaciones neuronales relacionadas con el control del apetito: las neuronas que expresan el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con Agouti (AgRP), que tienen la capacidad de estimular la ingesta, y las neuronas que expresan pro-opiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART), las cuales pueden suprimir la ingesta de alimentos (figura 2). La POMC es un polipéptido que se procesa post-transcripcionalmente para dar lugar a varios péptidos activos denominados melanocortinas, entre las que destacan, en relación con el control homeostático en el hipotálamo, las hormonas estimulantes de melanocitos (MSH) α y β , que se unen a los receptores de melanocortina (MCR) induciendo la supresión de la ingesta [61].

Se conocen 5 tipos distintos de receptores de melanocortina, todos ellos pertenecientes a la familia de la rodopsina y con 7 dominios transmembrana unidos a proteínas G. Los únicos receptores de melanocortina que se expresan en el cerebro y que están implicados en la regulación del balance energético son MC3R y MC4R. Se ha observado que los ratones deficientes en *mc3r* presentan un pequeño incremento en la adiposidad y en la ganancia de peso con una dieta baja en grasa [62, 63]. Los ratones nulos para el alelo *mc4r* que se someten a una dieta baja en grasa muestran hiperfagia, obesidad, hiperinsulinemia y un incremento de la masa corporal grasa y magra, exacerbándose esta respuesta con la exposición a una dieta rica en grasa [63, 64]. Se ha comprobado que la exposición de los ratones nulos para *mc3r* a una dieta rica en grasa hace que presenten características similares a sus homólogos nulos para *mc4r*, lo que sugiere que el MC3R puede tener un papel importante en la regulación del metabolismo periférico y el balance energético [63]. Un descubrimiento interesante en estos ratones es que la inducción de la expresión del gen *MC4R* en las neuronas del núcleo paraventricular incrementa la ingesta y disminuye el peso corporal [65]. Todos estos datos, en conjunto, subrayan la importancia de la señalización por melanocortinas en el núcleo paraventricular y apoyan la idea de la existencia de una red distribuida de neuronas sensibles a melanocortinas que regulan la homeostasis energética. Los humanos con mutaciones en el *MC4R* exhiben características similares a los ratones nulos para este receptor, lo que sugiere un papel crítico del MC4R en la regulación del balance energético en la fisiología humana [66, 67]. Además, se ha comprobado que las mutaciones en el gen del *MC4R* son la causa más común, descrita hasta ahora, de obesidad monogénica en humanos [68, 69].

CART es el tercer transcrito más abundante identificado en el hipotálamo y se localiza principalmente junto con POMC en neuronas del núcleo arcuato. Su función en la homeostasis energética no está clara. La administración intracerebroventricular del mismo provoca la supresión de la ingesta, mientras que la administración de su antisuero, la

incrementa [70]. Sin embargo, cuando se inyecta directamente en el núcleo paraventricular o en el núcleo arcuato de ratas en ayunas, causa un incremento en la ingesta después de 1 ó 2 horas [71], lo cual sugiere que CART podría tener efectos opuestos en la ingesta dependiendo del lugar de administración.

NPY y AgRP son péptidos que ejercen efectos orexigénicos, y que se colocan exclusivamente en neuronas del núcleo arcuato que presentan gran cantidad de proyecciones axonales a núcleos hipotalámicos adyacentes (paraventricular, dorsomedial y área hipotalámica lateral) [71]. NPY es el neuropéptido más abundante en el sistema nervioso central (SNC) [72]. En ratas, la inyección intracerebroventricular y bilateral en el núcleo paraventricular de NPY estimula la ingesta y la velocidad de ganancia de peso corporal, mediado por la estimulación de los receptores hipotalámicos Y1 e Y5 [73, 74]. AgRP es un potente antagonista selectivo de MC3R y MC4R, asociado, por tanto, con la obesidad y también con el incremento en la longitud corporal [75]. Estas neuronas NPY/AgRP pueden, además, expresar el neurotransmisor ácido gamma aminobutírico que es capaz de inhibir la acción de las neuronas POMC/CART [76, 77].

El núcleo paraventricular recibe proyecciones axonales desde el núcleo arcuato de neuronas NPY/AgRP así como POMC/CART. Este núcleo hipotalámico contiene neuronas que expresan factores anorexigénicos como la hormona liberadora de tirotrópina y la hormona liberadora de corticotropina. La inyección de hormonas orexigénicas o anorexigénicas en el núcleo paraventricular, como por ejemplo ghrelina, leptina, colecistoquinina u orexina altera la ingesta y el peso corporal [57]. La inyección de NPY en el núcleo paraventricular, al igual que su destrucción, causa hiperfagia y obesidad [74, 78], lo que implica que este núcleo tiene un papel inhibitorio en la ingesta y en el incremento del peso corporal. El área hipotalámica lateral, que también recibe proyecciones axonales desde el núcleo arcuato, contiene neuronas que expresan dos tipos de neuropéptidos orexigénicos: la hormona concentradora de melanina (MCH) y las orexinas. Los ratones transgénicos que sobreexpresan MCH desarrollan obesidad y resistencia a la insulina [79], mientras que los ratones deficientes en la prohormona precursora o en el receptor 1 de MCH son delgados [80]. Las neuronas del área hipotalámica lateral que sintetizan orexinas desarrollan proyecciones hacia diferentes regiones hipotalámicas y de otras partes del cerebro, promoviendo efectos orexigénicos en la ingesta [81].

Otro de los núcleos hipotalámicos implicados en el control del balance energético es el núcleo dorsomedial. Estas células neuronales, capaces de sintetizar α -MSH, reciben proyecciones de las neuronas NPY/AgRP del núcleo arcuato, que a su vez se proyectan hacia el núcleo paraventricular [82, 83]. Se ha observado que en ratones con obesidad inducida por

la dieta se produce un incremento significativo en la expresión de NPY en los núcleos dorsomedial y ventromedial [84]. Además, se sabe que la generación de una lesión en el núcleo dorsomedial causa hiperfagia y obesidad [85].

En el núcleo ventromedial existe una población celular de neuronas que expresan el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y que son capaces de suprimir la ingesta a través de su efecto sobre el MC4R [86]. La delección selectiva de neuronas BDNF en los núcleos ventromedial y dorsomedial de ratones adultos resulta en hiperfagia y obesidad [87]. Además, en los humanos las mutaciones en el gen *BDNF* causan obesidad; sin embargo, la forma en que este factor neurotrófico actúa regulando el balance energético se desconoce por el momento [88].

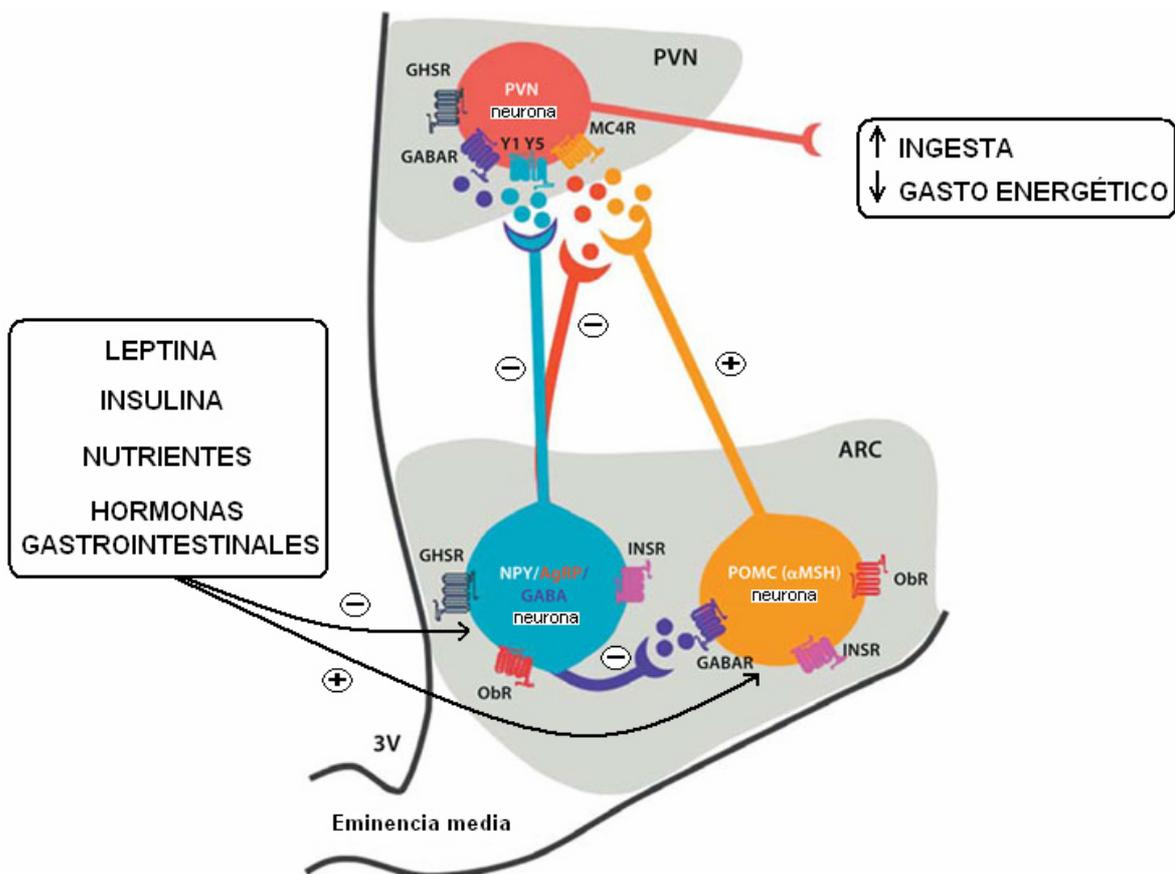


Figura 2. Ilustración representativa del control de la homeostasis energética en el hipotálamo (modificado de Briggs & Andrews. Metabolic status regulates ghrelin function on energy homeostasis. *Neuroendocrinology*, 2011; 93: 48-57). ARC: núcleo arcuato; PVN: núcleo paraventricular; 3V: tercer ventrículo; AgRP: péptido relacionado con Agouti; NPY: neuropéptido Y; POMC: pro-opiomelanocortina; GABA: ácido gamma-aminobutírico; αMSH: hormona estimulante de melanocitos α; ObR: receptor de leptina; INSR: receptor de insulina; GHSR: receptor de ghrelina; GABAR: receptor de ácido gamma-aminobutírico; MC4R: receptor de melancortinas 4; Y1-Y5: receptores del neuropéptido Y.

3.2. Hormonas gastrointestinales

La mayoría de las hormonas de origen gastrointestinal que intervienen en el control del balance energético tienen capacidad anorexigénica, excepto la ghrelina que tiene un efecto promotor de la ingesta, pudiendo actuar vía neuronal a través del nervio vago, o humoral a través del torrente sanguíneo, para originar la activación de diferentes regiones cerebrales. El papel de algunas de ellas como moléculas saciantes se conoce desde hace tiempo, pero la relevancia fisiológica de otras, y de todas en su conjunto, está por establecer.

A) Polipéptidos pancreáticos y péptidos derivados del glucagón

Los miembros de la familia de polipéptidos pancreáticos son, principalmente, el péptido tirosina tirosina (PYY) y el polipéptido pancreático. Están compuestos por una cadena de 36 aminoácidos homóloga entre ambos, con una estructura terciaria en forma de U que presenta una hélice de poliprolina [89]. Ambas hormonas pueden ejercer su acción central a través de los receptores Y del hipotálamo [90]. El PYY es una hormona supresora del apetito que se libera desde las células L del intestino distal en respuesta a la ingesta de nutrientes, junto con el péptido similar al glucagón 1 y la oxintomodulina [91]. Existen dos isoformas circulantes de este polipéptido, PYY₁₋₃₆ y PYY₃₋₃₆. La primera de ellas es la forma activa, la que se encuentra en mayor proporción y la que tiene afinidad por el receptor Y2 del hipotálamo. El patrón de secreción de PYY sugiere un papel en la saciedad. Esto es así, debido a que las concentraciones circulantes de PYY son bajas en el estado de ayuno e incrementan rápidamente, y en proporción a la ingesta de calorías, a continuación de una comida, con un pico una o dos horas después que permanece elevado durante varias horas más [92]. Los niveles circulantes de este polipéptido son bajos en las personas obesas y elevados en los pacientes con anorexia nerviosa [93, 94].

Las células F de los islotes de Langerhans son las encargadas de secretar el polipéptido pancreático en respuesta a la ingesta de alimentos, ejerciendo éste efectos anoréxicos en el tronco del encéfalo y en el hipotálamo a través del receptor neuronal Y4 o mediante el nervio vago [95, 96]. Los niveles plasmáticos del polipéptido pancreático presentan variaciones diurnas, con niveles menores a primera hora de la mañana y más altos por la tarde; siendo la liberación postprandial del mismo bifásica, con concentraciones circulantes de la hormona que incrementan después de una comida en proporción a la ingesta de calorías, y que se mantienen elevadas durante 6 horas [97]. Los niveles circulantes de este polipéptido parecen ser inversamente proporcionales a la adiposidad, presentando los sujetos con anorexia nerviosa los niveles más altos [98], mientras que los pacientes obesos con síndrome de Prader-Willi presentan una liberación reducida tanto basal como postprandialmente [99].

El glucagón, sus péptidos similares 1 y 2 (GLP), y la oxintomodulina son los péptidos derivados del gen proglucagón, cuya expresión abarca el páncreas, dónde el glucagón es predominante, el cerebro y el intestino, en los cuales el resto de productos del gen están mayoritariamente presentes [100]. Las células L del intestino secretan GLP-1 en respuesta a la ingestión de nutrientes, con la presencia de dos isoformas circulantes activas, GLP-1₇₋₃₇ y GLP-1₇₋₃₆ amida, de una potencialidad equivalente [101]. La segunda de ellas es la isoforma circulante en mayor proporción en los humanos y se distribuye a lo largo del SNC, encontrándose, entre otras regiones, en el hipotálamo y la hipófisis [102]. Esta hormona ejerce su acción central a través del nervio vago y mediante la interacción con su receptor, presente en neuronas y glía de los núcleos arcuato, paraventricular y supraóptico [103, 104]. Se ha comprobado que los niveles circulantes de GLP-1 suben en anticipación a una comida y después de ella, ejerciendo un efecto de reducción de la ingesta, además de suprimiendo la secreción de glucagón y retrasando el vaciado gástrico [105]; y disminuyen en el estado de ayuno [106]. Además, se sabe que los individuos obesos pueden tener una menor respuesta que los individuos con peso normal, a la acción reductora en la ingesta de GLP-1 cuando éste se administra de manera intravenosa [107].

La oxintomodulina es un péptido de 37 aminoácidos que se secreta junto con GLP-1 y PYY por las células L del tracto gastrointestinal en respuesta a la ingesta de comida y en proporción a las calorías de la misma [108]. Esta hormona tiene efectos anoréxicos, además de inhibidores de la secreción ácida y promotores del retraso en el vaciado gástrico [109]. Tanto en modelos experimentales como en humanos, la administración de oxintomodulina está asociada con una disminución de la ingesta y un incremento en el gasto energético [110, 111]. Su mecanismo de acción se ha asociado a los receptores GLP-1, sin embargo, en distintos estudios se ha observado que la afinidad mostrada por estos receptores es muy inferior a la que presenta la propia hormona GLP-1 [112, 113].

El glucagón se produce en las células alfa de los islotes pancreáticos y tiene la capacidad de aumentar la concentración de glucosa en respuesta a la hipoglucemia, además de promover la respuesta fisiológica del cuerpo frente al estrés mediante el incremento del gasto energético [114]. Sin embargo, la administración de glucagón disminuye la ingesta, posiblemente por modulación del tono vagal y el vaciado gástrico, así como el peso corporal, causando hiperglucemia [115].

B) Ghrelina y obestatina

La ghrelina se identificó, en su origen, como un ligando endógeno para el receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento en el estómago de la rata [116]. Está formada por una cadena de 28 aminoácidos que puede estar acilada, mediante la acción de la ghrelina

O-aciltransferasa, gracias a la presencia de un ácido octanóico unido al tercer residuo de serina. Esta hormona gastrointestinal es la única conocida que posee efectos orexigénicos, y se secreta, principalmente, por las células de las glándulas oxínticas de la mucosa gástrica [117], pudiendo actuar como un neurotransmisor en el núcleo arcuato y en el área periventricular del hipotálamo [116, 118], así como un estimulador de la secreción de hormona del crecimiento por la hipófisis [119].

Los niveles circulantes de ghrelina, que se presenta entre el 2 y el 20% en forma acilada (relacionada con la modulación del metabolismo de la glucosa) [120], se ven incrementados por el ayuno y disminuyen rápidamente en el periodo postprandial, pero no decrecen por ingestión de agua [121, 122]. En las ratas, los niveles de ghrelina exhiben un patrón diurno, cuyo punto álgido ocurre antes de los periodos de luz y oscuridad [123]. En los humanos, los niveles de ghrelina tienen un ritmo diurno idéntico al de la leptina, con la liberación de ambas hormonas incrementándose a lo largo del día hasta las 13:00h, para luego caer hasta su nivel más bajo a las 21:00h [122]. Tanto la administración central como periférica de ghrelina incrementa la ingesta y el peso corporal en roedores, junto con la disminución en la utilización de la grasa [121, 124]. Se ha comprobado que en los seres humanos existe una correlación negativa entre los niveles circulantes de ghrelina y el índice de masa corporal. Así pues, en el periodo de ayuno de los pacientes con anorexia nerviosa los niveles plasmáticos de ghrelina son altos [125], al igual que en sujetos con pérdida de peso inducida por la dieta [126]. En contraste, las personas obesas muestran un menor descenso en la ghrelina plasmática después de la ingestión de comida [127]. Además, en los pacientes con síndrome de Prader-Willi se aprecian niveles elevados de ghrelina circulante [128].

El mecanismo de acción de la ghrelina se basa en la activación, mediada por el receptor GHS-R1a, de las neuronas NPY/AgRP del núcleo arcuato del hipotálamo. Se ha comprobado que la administración periférica de ghrelina incrementa la expresión del factor de transcripción c-fos en las neuronas NPY/AgRP [129], y que la ablación de estas neuronas suprime completamente el efecto orexigénico de la hormona [130]. El tronco del encéfalo y el nervio vago también pueden contribuir a los efectos de la ghrelina sobre la ingesta. Esto es así, ya que la inyección intracerebroventricular de la hormona induce la expresión de c-fos en el núcleo del tracto solitario y en el área postrema [131]. Además, el receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento se expresa en el nervio vago, provocando el bloqueo de los aferentes vagales gástricos, la supresión de la ingesta inducida por ghrelina y previniendo el incremento en la expresión de c-fos en el núcleo arcuato [132].

La obestatina es un péptido de 23 aminoácidos, que se deriva de la escisión posttranscripcional de la preproghrelina, y que se libera desde el estómago [133]. La obestatina, a diferencia de la ghrelina, puede tener efectos anorexigénicos, disminuyendo la ingesta de alimentos, retrasando el vaciado gástrico y reduciendo el peso corporal [134]. Sin embargo, hay investigadores que ponen en entredicho este potencial anorexigénico de la obestatina ya que en algunos estudios en roedores tanto obesos como delgados, se han dejado de constatar los efectos de la hormona [135].

C) Colecistoquinina y amilina

La colecistoquinina fue la primera hormona intestinal descubierta implicada en el control del apetito, concretamente en la disminución de la ingesta de alimentos, además de en otras funciones fisiológicas como la liberación de enzimas desde el páncreas y la vesícula biliar, promoviendo la motilidad intestinal y retrasando el vaciado gástrico [136]. Esta hormona se secreta postprandialmente por las células del duodeno y el yeyuno, y posee una vida media corta en plasma de unos 15 minutos [137]. La infusión intravenosa de colecistoquinina es capaz de disminuir la ingesta en hombres delgados [138], sin embargo, se ha visto en ratas que la infusión intermitente de la hormona antes de la comida, reduciendo la cantidad de la misma, causa un incremento compensatorio en la frecuencia de las comidas [139].

Se conocen dos subtipos de receptores de colecistoquinina, CCK1 y CCK2, a través de los cuales esta hormona puede ejercer su acción [140]. Estos receptores se encuentran distribuidos por todo el cerebro, principalmente en el tronco del encéfalo y en el hipotálamo, siendo el primero de ellos clave en la acción anorexigénica de la colecistoquinina por su amplia presencia en el nervio vago [141]. Algunos estudios sugieren que la colecistoquinina puede interactuar sinérgicamente con la leptina para inducir la inhibición de la ingesta a corto plazo y la reducción del peso corporal a largo plazo, ya que los ratones deficientes en leptina son insensibles al efecto de la administración de colecistoquinina [142].

La amilina se libera, junto con la insulina, en respuesta a la ingestión de comida, y funciona como una hormona anorexigénica. La administración de esta hormona se asocia con una reducción de la ingesta y el peso corporal [143], pero se ha comprobado que los niveles circulantes de amilina son más elevados en sujetos obesos que en delgados [144], lo que sugiere algún mecanismo de resistencia en los individuos con sobrepeso. Los efectos anorexigénicos de la amilina pueden estar mediados por la actividad moduladora de la serotonina, la histamina y el sistema dopaminérgico, así como la inhibición de la liberación de NPY [144].

3.3. Tejido adiposo

Es un tejido conectivo formado por células propias derivadas del mesénquima encargadas de almacenar lípidos, denominadas adipocitos, y por un estroma reticular que da soporte a estas células, vasos sanguíneos y linfáticos, terminaciones nerviosas y otros tipos celulares como preadipocitos, fibroblastos, monocitos y macrófagos. En los vertebrados existen dos tipos de tejido adiposo, blanco y pardo. El tejido adiposo blanco está formado por adipocitos uniloculares, y entre sus funciones se incluyen la lipólisis y liposíntesis, la regulación de la ingesta, la protección mecánica y el aislamiento térmico. En cambio, el tejido adiposo pardo está relacionado con la termogénesis, y sus adipocitos son pluriloculares [145]. Los adipocitos maduros, casi de manera exclusiva, son capaces de sintetizar y secretar adipoquinas moduladoras del equilibrio homeostático, entre las que se encuentran la leptina, adiponectina, visfatina, vaspina y omentina [146, 147, 148]. Además, los monocitos y macrófagos de la matriz estromal pueden producir y secretar adipoquinas proinflamatorias como la resistina, la interleuquina 6 y el factor de necrosis tumoral alfa [149]. Por todo ello, el tejido adiposo se considera un órgano endocrino que puede comunicarse con el SNC, especialmente con el hipotálamo y la hipófisis [150], y a su vez, mediante adipotropinas el SNC se conecta con el adipocito [151].

Las células adipocíticas se pueden identificar a partir de la sexta semana de gestación en los humanos [145, 152]. En esta etapa del desarrollo intrauterino la gran mayoría de la grasa se acumula en forma de tejido adiposo pardo [145], sin embargo, durante todo ese proceso, pero principalmente en el tercer trimestre, los dos tipos de tejido adiposo se acumulan en una manera dependiente de la nutrición materna, representando el tejido adiposo pardo un rol esencial en la adaptación del recién nacido al ambiente extrauterino [152]. Después del parto, se incrementa el ritmo de diferenciación de las células del tejido adiposo blanco, sustituyendo éste casi por completo al tejido adiposo pardo. Este proceso es más acentuado en determinados periodos temporales, como en mitad de la infancia y en la adolescencia, especialmente en las niñas, y suele finalizar hacia los 18 años de edad; aunque la capacidad de generar nuevos adipocitos se sigue manteniendo a lo largo de la vida [153].

Está bien establecido que la obesidad induce una serie de cambios en el tejido adiposo: histológicos, metabólicos y endocrinos, que pueden estar determinados, principalmente, por tres factores [154-156]. El primero de ellos es la capacidad que posea el tejido adiposo blanco para diferenciar nuevos adipocitos, una vez que éstos han alcanzado un tamaño crítico — hipertrofia adipocítica —, y modificar, en consecuencia, su patrón de secreción paracrina y endocrina [157]. El segundo factor determinante de los cambios en el tejido adiposo es la suficiencia de éste para producir quimiocinas, lo que influye en el incremento de las poblaciones celulares proinflamatorias, esto es, monocitos y macrófagos,

contribuyendo, por lo tanto, a modificaciones en el patrón de secreción de adipoquinas [155, 158]. El cambio en el patrón de secreción de adipoquinas por los adipocitos hipertróficos respecto a los normales, es el último de los factores implicado en la respuesta del tejido adiposo a la obesidad [156, 159]. El impacto de cada uno de estos factores en relación a la obesidad va cambiando durante las diferentes etapas del desarrollo humano. Así pues, tanto los adultos obesos como los delgados conservan una población estable, en cuanto al número de adipocitos, en su tejido adiposo blanco; mientras que en los niños y adolescentes el número de adipocitos incrementa progresivamente, con una tasa de proliferación más rápida en los sujetos obesos [160], lo que implica un incremento del riesgo de desarrollo de obesidad severa y comorbilidad en etapas posteriores de la vida [160, 161].

La resistencia periférica a la acción de la insulina es considerada como la base fisiológica de todos los trastornos metabólicos relacionados con la obesidad [162]. La cantidad y especialmente la distribución anatómica del tejido adiposo durante el desarrollo, son los factores más importantes en la generación de la resistencia a la insulina; estando el tejido adiposo visceral, fundamentalmente, implicado en este proceso [163]. El patrón de secreción de adipoquinas en los pacientes obesos, principalmente en los niños, es el principal determinante de la obesidad asociada a la resistencia a la insulina; siendo la adiponectina, visfatina y vaspina las citoquinas proinflamatorias más importantes implicadas en este proceso [149].

3.3.1. Leptina: implicaciones fisiológicas en la homeostasis y la pubertad

La prueba de la implicación del tejido adiposo en el control de la homeostasis energética y el desarrollo puberal se puso de manifiesto con el descubrimiento e identificación de la leptina y sus receptores específicos, mediante el estudio de ratones ob/ob genéticamente obesos y humanos con deficiencia congénita de leptina o de su receptor [164-167]. Los sujetos con esta deficiencia congénita presentan una obesidad mórbida de comienzo precoz y una carencia de desarrollo puberal, que se puede revertir mediante el tratamiento con leptina recombinante [168].

La leptina es un polipéptido de 16 KDa (figura 3) que se sintetiza, principalmente, en los adipocitos diferenciados, amén de diferentes tejidos [169]. Tanto en los humanos como en los mamíferos, esta hormona actúa como una señal de adiposidad más que como una señal reguladora de la saciedad [170, 171]. Esto es así, debido a que los niveles circulantes de esta hormona se correlacionan directamente con el contenido en grasa corporal, pudiendo variar en proporción a la masa grasa y al contenido de triglicéridos, aunque con una considerable variabilidad entre individuos para un índice de masa corporal concreto [170, 172]. La leptina puede circular en la sangre tanto de manera libre como unida a proteínas, principalmente a la

isoforma soluble de su receptor específico (sLepR), con una variación circadiana de sus niveles presentando los mayores valores durante la noche [169]. El receptor de leptina (LepR) pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas clase 1 y se encuentra distribuido por todo el cuerpo, estando la isoforma activa (larga) expresada principalmente en el hipotálamo. La isoforma soluble del receptor es la encargada de regular su disponibilidad y actividad, pudiendo cuantificarse unos niveles circulantes de la misma inversamente proporcionales a los de la hormona [169, 173].

Los pacientes obesos presentan un “estado de resistencia a la leptina” en el que se observa un incremento en los niveles circulantes de leptina, así como una reducción en los niveles de sLepR, cuyo resultado es la saturación de los LepR, afectándose, en consecuencia, la correcta señalización por leptina [174]. Tras la pérdida de peso, este estado puede ser parcialmente revertido, apreciándose una disminución de los niveles de leptina y un incremento de los niveles de sLepR [149, 161, 175]. La situación contraria puede suceder en circunstancias de desnutrición como la anorexia nerviosa [175].

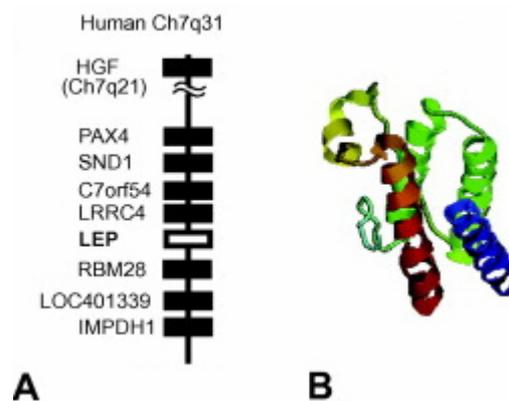


Figura 3. Posición del gen de la leptina en el cromosoma humano (A) [NCBI Map Viewer] y estructura terciaria de la proteína (B) con cuatro hélices alfa y un puente disulfuro entre las cisteínas 96 y 146, necesario para su actividad biológica [Protein Data Bank].

A) Señalización intracelular por leptina:

La acción que ejerce la leptina sobre diferentes poblaciones neuronales en el sistema nervioso central, predominantemente en el hipotálamo y el tronco del encéfalo [176], puede verse potenciada por la acción de la insulina, de la misma manera que el incremento de leptina puede mejorar la resistencia a insulina [177, 178]. Esto es así, debido a que ambas hormonas comparten rutas de señalización intracelular (figura 4).

Las principales dianas de la leptina son las neuronas POMC/CART y NPY/AgRP del núcleo arcuato, las cuales activa e inhibe, respectivamente [170, 172]. La unión de la leptina a

su receptor exhibe unas propiedades cinéticas simples, lo cual sugiere que sólo una molécula de leptina se une al dominio extracelular del dímero que conforma el LepR [179]. Esta unión induce la autofosforilación de las Janus quinasas 2 (JAK-2), que están asociadas de manera no covalente al receptor [180], provocando seguidamente la fosforilación de distintos residuos de tirosina (985, 1077 y 1138) presentes en el dominio intracelular del receptor. El último de los residuos de tirosina, gracias a su dominio 2 homólogo a Src, es el encargado de reclutar al transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) para que sea fosforilado en su residuo tirosina 705 y/o serina 727 por JAK-2 [181, 182]. Inmediatamente, STAT3 se dimeriza y se transloca al núcleo para modular la transcripción de diferentes genes, activando POMC y CART e inhibiendo NPY y AgRP [179]. Uno de los genes que se activan en el núcleo es el supresor de la señalización por citoquinas 3 (SOCS3), que actúa como un regulador negativo de la señalización intracelular por leptina inhibiendo JAK-2 y STAT3 directamente [183, 185] o inhibiendo la fosforilación del residuo de tirosina 985, que está implicado en la activación de la ruta ERK1/2 a través del complejo Shc-Grb2-Sos, y en menor grado del residuo 1077 [179, 181]. Otro regulador negativo de la señalización por leptina es la proteína fosfatasa 1B (PTP1B) que está asociada a la cara interna de la membrana plasmática, y que actúa sobre JAK-2 provocando su desfosforilación [185].

JAK-2 también puede activar la ruta mediada por el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS), la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa específica de serina/treonina (Akt). Esta vía de señalización puede modular tanto la transcripción génica como la actividad celular, gracias al factor de transcripción 1 con dominio de unión en cabeza de tenedor (FOXO-1) y a la activación de canales catiónicos TRPC y de potasio dependientes de ATP [186, 187]. Conjuntamente, se produce la activación de la vía de la quinasa S6 y de la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR), provocando la regulación de la transcripción y la activación de la síntesis proteica [188, 189]. El homólogo de la fosfatasa y la tensina (PTEN) es un regulador negativo de esta vía que actúa hidrolizando el PI3K [190].

A diferencia de la leptina, la unión de la insulina a su receptor exhibe propiedades cinéticas complejas, lo que sugiere que una molécula de insulina se puede unir y activar el receptor, pero otra molécula de insulina también se puede unir a un sitio de unión de baja afinidad [179]. El receptor de insulina tiene dos subunidades alfa extracelulares a las que se puede unir la hormona induciendo la autofosforilación de las dos subunidades beta intracelulares que poseen 8 residuos de tirosina. Seguidamente, el receptor de insulina recluta y fosforila proteínas IRS que activan la misma vía de señalización PI3K-Akt activada por leptina [179]. Los mismos reguladores negativos SOCS3 y PTP1B que inhiben la señalización por leptina, pueden ejercer también sus efectos sobre el receptor de insulina o directamente sobre IRS1 [191, 192].

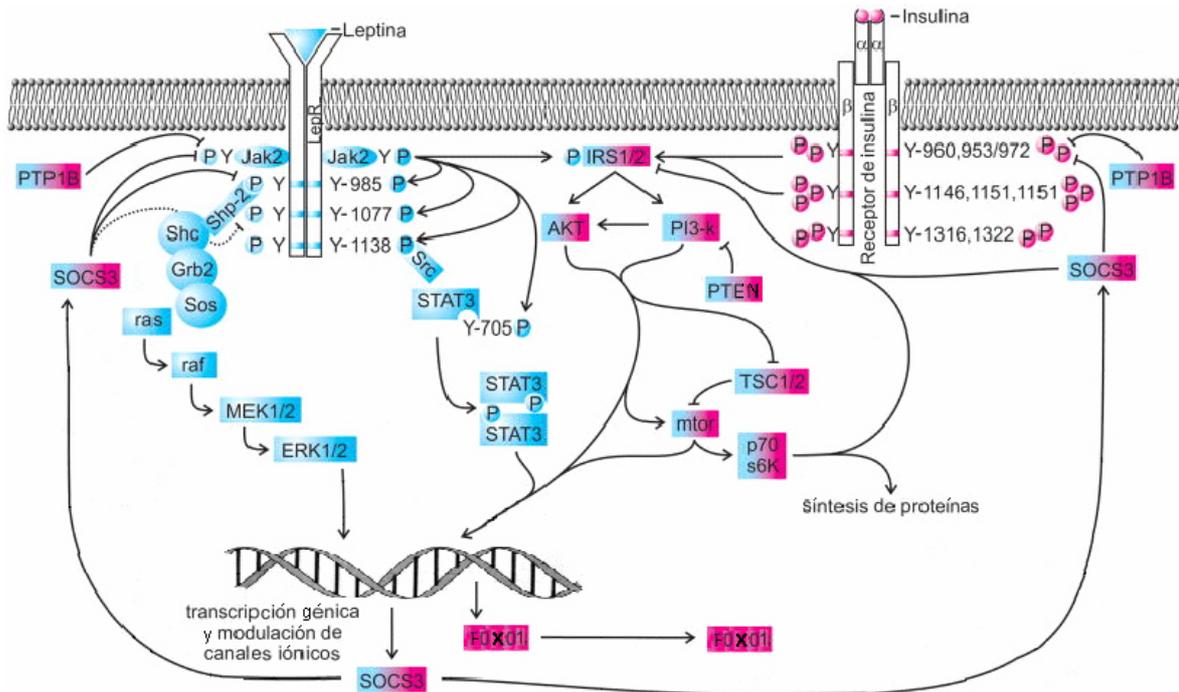


Figura 4. Ilustración representativa de la señalización intracelular por leptina e insulina (modificado de Williams *et al.*, 2011 [179]). LepR: receptor de leptina; Jak2: Janus quinasa 2; Y: tirosina; P: fosforilado; Src: tirosina quinasa; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; IRS: sustrato del receptor de insulina; PI3-k: fosfoinositol-3 quinasa; AKT: proteína quinasa específica de serina/treonina; TSC: complejo de esclerosis tuberosa; mtor: diana de la rapamicina en mamíferos; p70s6K: quinasa ribosómica; Shp-2: proteína tirosina fosfatasa; Shc: proteína adaptadora de la señalización; Grb2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico; Sos: factor intercambiador de nucleótidos de guanina; ras: proteína G; raf: proteína quinasa; MEK: quinasa activada por mitógenos; ERK: quinasa relacionada con señal extracelular; SOCS3: supresor de la señalización por citoquinas 3; PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B; PTEN: homólogo de la fosfatasa y la tensina; FOXO-1: factor de transcripción 1 con dominio de unión en cabeza de tenedor.

B) Papel de la leptina en el crecimiento y el desarrollo:

La leptina, además de su función moduladora en el equilibrio homeostático, está implicada en funciones tales como la inmunidad, el crecimiento, el metabolismo óseo, el desarrollo y el control de los ejes hipotálamo-hipofisarios [170-172]. En los humanos, durante el crecimiento y el desarrollo se producen una serie de factores que pueden estimular la síntesis de leptina: insulina, estrógenos y glucocorticoides, y otros factores que inhiben esta hormona, caso de los andrógenos [149]. Por ello, es de gran importancia el estudio de la dinámica y la actividad de la leptina durante la infancia, y particularmente, en la obesidad infantil.

En el recién nacido, los niveles séricos de leptina y la disponibilidad de la misma están determinados por la edad gestacional y el peso en el nacimiento, siendo éstos menores, así como los niveles de sLepR mayores, en los recién nacidos prematuros, de manera inversa a lo que sucede en los recién nacidos macrosómicos [193, 194]. La longitud en el nacimiento puede ser un indicador predictivo de la ganancia de peso corporal en la infancia [195], siendo,

por tanto, los niveles neonatales de leptina un indicador de la cantidad de tejido adiposo blanco en el recién nacido [196]. Es interesante destacar que podría existir un dimorfismo sexual presente desde edades muy tempranas, ya que se ha observado una tendencia a presentar mayores niveles de leptina en niñas prematuras recién nacidas respecto a los niños [194, 195].

A lo largo del desarrollo puberal los niveles de leptina van aumentando en las niñas, mientras que en los niños van decreciendo; de la misma manera que los niveles de sLepR disminuyen en ambos sexos después del comienzo de la pubertad, resultando en un incremento en la leptina libre que es más acentuado en las niñas adolescentes [175, 197]. Estos datos se han interpretado por algunos autores como una posible señal para el SNC informando acerca de la idoneidad de las condiciones metabólicas necesarias para llevar a término el desarrollo puberal [161, 198].

En las mujeres adultas la proporción entre la leptina y su receptor es mayor que en etapas anteriores, y es muy probablemente el resultado de cambios en la masa grasa y en los esteroides sexuales. Por ello, el índice de masa corporal y el porcentaje y distribución de la grasa en el cuerpo pueden ser los factores predictivos más importantes de los niveles de leptina libre circulante [199, 200]. En relación con lo anterior, se sabe que los esteroides sexuales pueden influir en la proporción leptina-receptor a través de la regulación de la cantidad y distribución de la masa grasa, además de la modulación directa del control transcripcional de la leptina, actuando la testosterona como inhibidor y los estrógenos como estimuladores de la transcripción y secreción de la leptina [201].

C) Relación entre la obesidad y la pubertad: posible rol de la leptina

La pubertad es un proceso fisiológico complejo que se puede describir como una transición continua a la edad adulta, que ocurre dentro de un periodo definido de tiempo. Este proceso es distinguible por el desarrollo de los órganos genitales, los caracteres sexuales secundarios y la resultante capacidad para reproducirse. En los humanos y los primates superiores la pubertad culmina con la menarquia, el primer ciclo menstrual en las hembras [202, 203]. Es importante destacar que existen diferencias en la maduración puberal entre especies y entre sexos, las cuales dependen del fondo genético, siendo éste altamente influenciado por las condiciones fisiológicas del individuo, en particular, el estatus nutricional, la etapa de desarrollo, el crecimiento y las condiciones medioambientales [204, 205].

En muchas especies, incluidos los humanos, la pubertad se inicia en respuesta a un incremento en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, inducido primeramente por un incremento en la pulsatilidad de las neuronas productoras de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), con la consiguiente liberación de ésta en pulsos secretores sostenidos a una alta frecuencia. De esta manera, se induce la síntesis de gonadotropinas y la secreción desde la hipófisis, y esto, a su vez, conduce al desarrollo de las gónadas, la síntesis y secreción de esteroides sexuales y la maduración de los gametos [202, 203]. En las niñas, la elevada producción de estrógenos durante el desarrollo puberal promueve el desarrollo mamario y contribuye a la redistribución de la grasa corporal, mientras que en los niños la producción de andrógenos induce cambios en el sistema músculoesquelético, la espermatogénesis y el crecimiento testicular. Como resultado de estos cambios, el proceso de desarrollo puberal se puede detectar a través de la identificación de estas señales físicas [204].

Los factores o cambios fisiológicos que inducen el incremento en la frecuencia pulsátil de estas neuronas GnRH, situadas en el área preóptica — sólo en los humanos — y en la base del hipotálamo, son inciertos. No se sabe si estas neuronas presentan una alta restricción inhibitoria, una falta de influencia excitatoria o ambas cosas [206, 207]. Diferentes estudios sugieren que un aumento en las señales excitatorias y/o en la sensibilidad al glutamato, además de en los receptores de kisspeptina, serían procesos clave para la promoción de la actividad de las neuronas GnRH [206, 208]. Por otra parte, la supresión de la restricción inhibitoria o la reducida sensibilidad a la retroalimentación negativa también parecen jugar un papel importante [206, 207, 209]. Otros estudios apuntan a la existencia de un control epigenético de las neuronas GnRH, en el que las condiciones ambientales desempeñarían una función clave en el desarrollo puberal [205]. Hasta el momento se han identificado una serie de señales consideradas por diferentes autores como “permissivas” para el comienzo de la pubertad, como el caso de la leptina; sin embargo, sus mecanismos de acción en el inicio de la pubertad aún se desconocen [206, 210].

El estatus nutricional de un individuo se reconoce como un factor determinante para el comienzo de la pubertad [211, 212]. Está documentado que la edad de comienzo de la pubertad en las niñas (desarrollo mamario, estadio II de Tanner) ha disminuido desde finales del siglo XIX hasta nuestros días. Se cree que esto se debe a la mejora de la salud pública y la alimentación [213-215]. Las variaciones en las condiciones nutricionales, como una dieta o el aumento en el gasto energético, pueden influir en el comienzo y progresión de la pubertad en muchas especies, incluyendo roedores y primates. Esto es así porque muchos aspectos de la fisiología reproductiva de ambos sexos están ligados a la disponibilidad energética,

como por ejemplo la territorialidad y el cortejo en los machos, y el embarazo y la lactancia en las hembras [204].

Los estudios experimentales de Kennedy y Mitra [211] fueron fundamentales para describir los efectos de la alimentación y el tamaño corporal en el comienzo de la pubertad. Pudieron comprobar que el tiempo de comienzo de la pubertad en ratas está correlacionado con el tamaño corporal, y no con la edad cronológica. Posteriormente, en estudios epidemiológicos en humanos se evidenciaron descubrimientos similares, dando lugar a la hipótesis de que para un correcto desarrollo puberal se requiere una cantidad crítica de grasa corporal [212, 214, 215]. Estos estudios enfatizaron en el hecho de que la condición de extrema delgadez podría retrasar el inicio y progresión de la pubertad. Sin embargo, en las últimas dos décadas, diferentes estudios han constatado una incidencia creciente en el comienzo temprano de la pubertad en niñas [216-218], algunos de los cuales sugieren que las niñas obesas llegarían a la pubertad en una edad más temprana [219, 220].

Estas publicaciones se han interpretado de diferentes maneras y, en su momento, generaron un intenso debate en la comunidad científica acerca de si realmente el comienzo de la pubertad estaría avanzando en la población, o simplemente la monitorización del mismo se estaría llevando a cabo de manera equivocada. Algunas inconsistencias metodológicas son evidentes en estos estudios, como por ejemplo, la utilización del estadio II de Tanner, determinado por evaluación visual o palpación, en el que etapas tempranas del desarrollo mamario podrían confundirse con depósitos de grasa. Asimismo, no se han incluido en los estudios factores ambientales como el estrés o la exposición a disruptores endocrinos, así como el análisis de los niveles de esteroides sexuales y gonadotropinas, particularmente relevantes en los estados iniciales del desarrollo mamario. Igualmente, los estrógenos también se pueden generar a partir de la aromatización de andrógenos adrenales, un proceso facilitado por el incremento en la producción de aromatasa en los adipocitos [221]. Por todo ello, es posible que el desarrollo mamario temprano en las niñas obesas sea la consecuencia de un incremento en la producción de estrógenos a partir de adipocitos maduros y no a partir de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, y por lo tanto no representaría un auténtico comienzo de la pubertad. La falta de datos concluyentes que demuestren, en relación con lo anterior, reducciones paralelas en la edad de la menarquia en niñas obesas y no obesas favorece este argumento, sugiriendo una disociación temporal entre los signos iniciales de la telarquia y el final del desarrollo puberal marcado por la primera menstruación [218, 222, 223]. Se ha demostrado que las niñas con sobrepeso que presentan un desarrollo mamario precoz de progresión lenta y una adrearquia prematura, exhiben una disminución en la pulsatilidad de la hormona luteinizante. Esto sugiere que, en estas condiciones, la

adiposidad podría promover un aparente comienzo temprano de la pubertad pero con una progresión lenta [224].

En el caso de los niños, los datos disponibles en relación con el estudio de la pubertad presentan contradicciones, a pesar de lo cual parece que la edad de maduración puberal en niños obesos tendería a retrasarse [225, 226], lo que se podría explicar, al menos parcialmente, por el incremento de la aromatización de los andrógenos a estrógenos debido a la adiposidad [218]. No obstante, se necesita seguir investigando para obtener datos adicionales y más precisos en este sentido.

Está bien establecido que el balance y la interacción entre las señales metabólicas y la fase de desarrollo son muy importantes para el control del comienzo de la pubertad y la correcta maduración sexual [210, 227]. Un claro ejemplo de esta interacción son los ratones ob/ob deficientes en leptina, que presentan obesidad mórbida a causa de su hiperfagia y disminución del gasto energético, además de una serie de anormalidades endocrinas [164]. El incremento de adiposidad en estos ratones se puede observar en edades postnatales muy tempranas, y es fácilmente detectable en el destete. El desarrollo embrionario y postnatal de los órganos sexuales es aparentemente normal, pero, tanto los machos como las hembras, no son capaces de iniciar la pubertad. Mediante la restricción de comida se consigue disminuir el peso corporal, pero no se logra restituir la fertilidad; sin embargo, cuando se proporciona leptina, se puede alcanzar el desarrollo puberal y la fertilidad [228]. Los niveles de gonadotropinas en los ratones ob/ob de ambos sexos son menores respecto de los controles; sin embargo, las células gonadotropas de la hipófisis responden de forma apropiada a los cambios en GnRH. De la misma manera, y a pesar de la gran cantidad de grasa corporal, los niveles circulantes de esteroides sexuales también están disminuidos [229]. Los testículos y ovarios de los ratones deficientes en leptina son más pequeños y presentan diversas anormalidades morfológicas y bioquímicas. El lumen de los túbulos seminíferos está hueco y contiene menor cantidad de espermatozoides. Asimismo, las células de Leydig muestran un reducido tamaño debido a la disminución del contenido citoplásmico [230]. Los ovarios tienen un número similar de folículos primordiales, primarios y secundarios comparado con los control, pero no tienen folículos de Graaf ni cuerpo lúteo funcionales, pero cuando se transplantan los ovarios de las hembras ob/ob a sus homólogas normales, se producen esteroides sexuales y los ovocitos son viables [231]. Otro dato interesante en estos ratones es que la expresión génica y el patrón de distribución de las neuronas GnRH es similar a los control, lo que sugiere que la vía de migración normal de estas neuronas tendría lugar durante el desarrollo, siendo, por tanto, la ausencia en el incremento de la pulsatilidad de las neuronas GnRH el factor primario causal que impide el comienzo de la pubertad [229, 232].

Los humanos con obesidad monogénica causada por mutaciones de pérdida de función en el gen de la leptina, exhiben un fenotipo reproductivo muy similar a los ratones ob/ob [228, 233]. Estos individuos presentan una obesidad mórbida de comienzo temprano y no entran en pubertad. El tratamiento con leptina recombinante corrige su fenotipo metabólico e incrementa la frecuencia de secreción de gonadotropinas [168, 228]. Es importante resaltar que la terapia de reemplazo de leptina en niños deficientes en la hormona, que se lleva a cabo en una etapa de desarrollo temprano, no induce pubertad precoz, lo que indica que el papel de la leptina en el comienzo de la pubertad depende del desarrollo del individuo [168]. Este hecho apoya la idea del papel de la leptina como un factor permisivo más que como un desencadenante de la pubertad.

Los efectos reguladores de la leptina sobre la fisiología reproductiva están mediados, al igual que en el caso del apetito, por la isoforma larga del receptor de leptina que se expresa en el cerebro [234, 235]. Esto es así, ya que las mutaciones con pérdida de función de este receptor, tanto en humanos como en ratones, producen un fenotipo metabólico y reproductivo similar al de los sujetos deficientes en leptina [236]. En diferentes especies y en ambos sexos, está bien establecido que la leptina actúa en el cerebro para incrementar el ritmo pulsátil de secreción de GnRH [237, 238]. Sin embargo, hay datos contradictorios acerca de si la leptina ejerce su acción a través de su receptor expresado en las neuronas GnRH [239]. Quennell y colaboradores [240] observaron que en ratones knockout para el receptor de leptina de las neuronas GnRH, se producía una maduración sexual correcta, con la consiguiente capacidad reproductiva intacta. Otros estudios posteriores demostraron que las neuronas GnRH de ratón no expresan prácticamente receptor de leptina [239, 241]. Por lo tanto, la acción de la leptina para estimular la secreción de GnRH debe de ejercerse a través de otras neuronas que converjan finalmente en las neuronas GnRH. Existen dos áreas en el hipotálamo con poblaciones neuronales que expresan receptores de leptina, y que inervan directamente a las neuronas GnRH: el núcleo premamilar ventral y el núcleo estriohipotalámico [241].

Alternativamente, los efectos de la leptina sobre el eje neuroendocrino reproductivo se pueden ejercer a través del sistema kisspetina/Gpr54, el cual controla, a su vez, la actividad neuronal GnRH [232, 241, 242]. Las kisspeptinas, los productos del gen Kiss1, y su receptor Gpr54 son factores esenciales en el control de la maduración sexual. En humanos y ratones se ha comprobado que las mutaciones con pérdida de función en Kiss1 o Gpr54 provocan hipogonadismo hipogonadotropo, resultando, por tanto, en una falta de desarrollo puberal [244, 245]. Debido a las similitudes que presentan en cuanto a sus fenotipos reproductivos, los individuos con mutaciones con pérdida de función tanto en los genes de leptina y kisspeptina como en los genes de sus receptores afines, el sistema Kiss1-Gpr54 se ha convertido en el principal candidato como mediador de los efectos de la leptina en la

pubertad. Así pues, distintos grupos de investigación han observado que las neuronas kisspeptina del núcleo arcuato expresan receptores de leptina; sin embargo, en algunos laboratorios se demuestra un grado de colocalización moderado o alto [246, 247], mientras que en otros las tasas de colocalización son muy pequeñas [241, 242]. A pesar de estos resultados contradictorios, se ha comprobado en diferentes estudios que las condiciones metabólicas que propician niveles bajos de leptina, como el caso de ratones mutantes o en estados de balance energético negativo, resultan en una disminución de la expresión de Kiss1 o en una producción aminorada de kisspeptinas [248-250]. Un descubrimiento importante a destacar es que tras la delección selectiva de los receptores de leptina de las neuronas Kiss1, los ratones sometidos a este proceso mostraron un desarrollo puberal, maduración sexual y fertilidad normales [232], lo que indica que no se requeriría la acción directa de la leptina en las neuronas Kiss1 para el comienzo normal de la pubertad. En relación con esto, se ha demostrado que las hembras de ratón con ablación de las neuronas kisspeptina no presentan ningún déficit en el desarrollo puberal [252].

Aún se necesita clarificar si estos resultados reflejan la presencia de sistemas de redundancia y/o adaptaciones relacionadas con el desarrollo; pero lo que sí han demostrado es que el receptor de leptina se expresa en las neuronas Kiss1 del núcleo arcuato pero no en las neuronas Kiss1 del área preóptica [241, 242, 250], que las neuronas Kiss1 que expresan receptores de leptina en el núcleo arcuato no inervan directamente a las neuronas GnRH [241], y que no se requiere la acción directa de la leptina en las neuronas Kiss1 para la maduración puberal y la fertilidad [232]. Estos estudios también sugieren que los cambios en la expresión de Kiss1 y en la producción de kisspeptinas en estados de niveles disminuidos de leptina, están mediados por rutas neuronales indirectas o por la acción directa de señales metabólicas alternativas aún no identificadas.

Diversos autores han demostrado que el núcleo premamilar ventral juega un papel clave en la mediación de los efectos de la leptina en el inicio de la pubertad, sugiriendo que esta área sería la encargada de integrar las señales metabólicas, reproductivas y del medio ambiente [239, 252, 253]. Las proyecciones neuronales del núcleo premamilar ventral se extienden a zonas del cerebro relacionadas con el control reproductivo, como el núcleo periventricular anteroventral, el núcleo preóptico medial, el núcleo medial de la amígdala y el núcleo estriado [254, 255]. Asimismo, el núcleo premamilar ventral contiene gran cantidad de neuronas que expresan receptores de leptina y que se proyectan directamente a neuronas GnRH [241, 252]. Una alta proporción de estas neuronas produce dos tipos de neurotransmisores: glutamato y óxido nítrico, y se pueden despolarizar por acción de la leptina [252, 256, 257], lo que sugiere que estas células son potencialmente estimuladas por niveles cambiantes de la hormona circulante; lo cual a su vez puede activar las neuronas

GnRH y las del núcleo periventricular anteroventral [232]. Se ha comprobado que en ratones hembra nulos para el receptor de leptina, la inducción de la expresión endógena del mismo selectivamente en las neuronas del núcleo premamilar ventral, induce el comienzo del desarrollo puberal y mejora la fertilidad, sin embargo, en los machos no se aprecia ninguna mejora en su fisiología reproductiva [232]. Además, en ratones hembra ob/ob, la lesión del núcleo premamilar ventral provoca un retraso significativo en el desarrollo puberal, que se logra inducir por la administración de leptina [232]. Así pues, estos descubrimientos sugieren que la acción de la leptina en las neuronas del núcleo premamilar ventral es necesaria y suficiente para el desarrollo puberal normal de la hembra de ratón (figura 5).

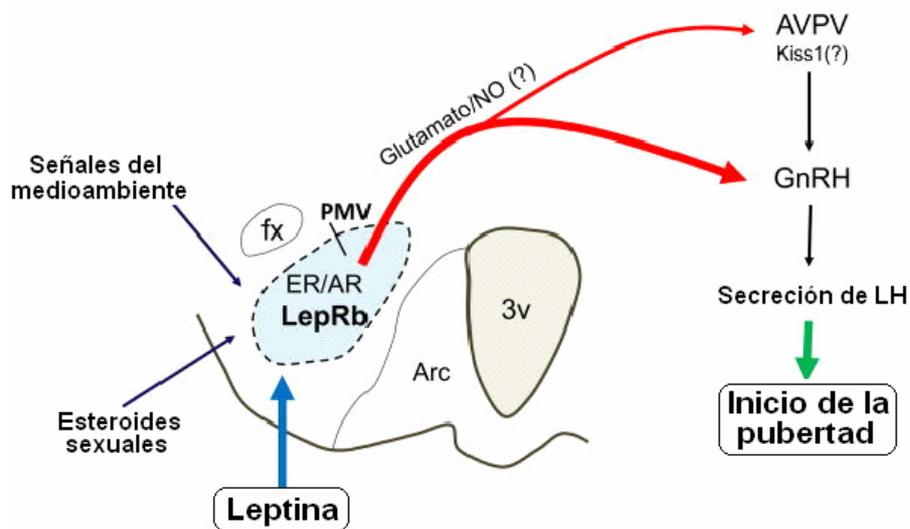


Figura 5. Ilustración representativa de la posible ruta neuronal mediadora del efecto de la leptina en el comienzo de la pubertad (modificado de Carol F. Elias [204]). 3v: tercer ventrículo; Arc: núcleo arcuato; PMV: núcleo premamilar; LepRb: receptor de leptina; ER/AR: receptores de estrógenos y andrógenos; NO: óxido nítrico; AVPV: núcleo periventricular anteroventral; GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas; LH: hormona luteinizante.

A pesar de todos estos estudios, aún quedan diferentes elementos por determinar en torno al papel de la leptina en el comienzo de la pubertad. Como se ha mencionado anteriormente, se cree que la acción de la leptina está mediada por los receptores específicos que se expresan en el cerebro. Sin embargo, tanto la isoforma corta del receptor como la larga se encuentran en varios órganos periféricos, además de en las gónadas y la hipófisis, desconociéndose la relevancia fisiológica de ellas fuera del cerebro. Muchos de los datos acerca de los efectos permisivos de la leptina en el comienzo de la pubertad se han generado usando modelos animales de deficiencia de leptina o de su receptor, pero el papel de la hormona a niveles fisiológicos normales aún no está claro [204]. Aunque se sabe que la leptina ejerce un efecto inhibitorio en la esteroidogénesis [258], lo que aumenta la aromatización y favorece la producción de estrógenos cuando existe una alta disponibilidad

de andrógenos [259]; se desconoce si este mecanismo guarda relación con el aparente incremento en la tasa de las niñas obesas que adelantarían el comienzo de la pubertad. Si este comienzo temprano de la pubertad estaría reflejando una activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, y si estos efectos periféricos podrían explicar el retraso en la maduración sexual en los niños obesos, se desconoce y debe de ser investigado más profusamente.

Anteriormente se indicó la existencia de estudios en ratones que demostraron que no se requiere que la leptina actúe sobre las neuronas Kiss1 para el correcto desarrollo puberal. Sin embargo, se ignora la presencia de posibles mecanismos o sistemas paralelos redundantes que puedan compensar la falta de señalización por leptina en las neuronas Kiss1, o si la acción de la leptina en estas neuronas es suficiente para inducir la pubertad en ausencia de estas posibles rutas. La acción selectiva de la leptina en las neuronas del núcleo premamilar ventral es suficiente para inducir la pubertad en ratones hembra nulos para el receptor de leptina, pero no en machos. Esto sugiere la existencia de un circuito sexualmente dimórfico por el cual la leptina actuaría en el comienzo de la pubertad. Otra cuestión por determinar es si las neuronas del núcleo premamilar ventral actúan directamente sobre las neuronas GnRH, activan primeramente a las neuronas kisspeptina y/o activan otra ruta indirecta. En relación con esto, también debe establecerse si ese efecto está mediado por neurotransmisión glutamatérgica y/o nitrérgica, y si está ello causado por la plasticidad sináptica de las neuronas GnRH en la eminencia media.

Otros aspectos importantes que hay que investigar en mayor profundidad son el papel que juegan las neuronas estriohipotálamicas en el comienzo de la pubertad y cuáles son las rutas de señalización, los cambios en la expresión génica y/o la actividad celular, por los cuales la leptina puede ejercer su efecto permisivo en el desarrollo puberal.

4. Hipótesis

La sobrenutrición neonatal, con el consiguiente desarrollo de sobrepeso prepuberal, produciría un cambio en la sensibilidad central a la leptina que modificaría el comienzo de la pubertad.

5. Objetivos

1. Determinar si la sobrenutrición neonatal afecta a la señalización basal por leptina en el hipotálamo a lo largo del desarrollo postnatal, y cómo este hecho se correlaciona con cambios en los niveles circulantes de leptina.
2. Estudiar si la sobrenutrición neonatal modifica la señalización central basal por leptina de manera diferente en machos y hembras durante el desarrollo.
3. Investigar si la sobrenutrición neonatal modifica la respuesta central a un aumento agudo de leptina pre- y peripuberalmente, y si esta respuesta es diferente en machos y hembras.
4. Determinar si el aumento agudo de leptina en la etapa peripuberal de los machos y hembras sobrenutridos neonatalmente implicaría una activación del eje hipotálamo-hipofisario.

II. Material y métodos

1. Modelos experimentales

Para lograr los objetivos marcados en este estudio se desarrollaron dos modelos fisiológicos de sobrepeso mediante la manipulación del tamaño de la camada de ratas Wistar provenientes de cruces entre hembras y machos, ajustando el número de crías el día del nacimiento a 4 ó 12 por madre hasta el momento del destete (día 21), con igualdad de sexos por camada, con pesos y longitudes equivalentes (entre 5,7 y 6,3 gramos, entre 4,6 y 5,0 cm) y con realización de “cross-fostering”. Esta distribución permite que las camadas de 4 crías tengan una mayor disponibilidad de nutrientes durante la lactancia y, por ende, desarrollan un mayor peso corporal respecto a las camadas de 12 crías, tomadas éstas como control. Las manipulaciones experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con las Normas de Ética en la Investigación con Animales de la Unión Europea y fueron aprobadas por el respectivo Comité Ético (Real Decreto 1201/2005). Los animales utilizados en este estudio procedían de Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, España.

1.1. Modelo de sobrepeso durante el desarrollo

Para llevar a cabo este modelo se fijaron 5 puntos experimentales en los días postnatales 10, 21, 30, 50 y 85, correspondiendo los tres primeros al periodo prepuberal y los dos últimos al periodo postpuberal (figura 6). En todos los puntos se estudiaron ambos sexos, controlando el peso y la longitud, y estabulando a los animales en parejas del mismo sexo a partir del día 21 (destete). Entre las 09:00 y las 11:00h de cada uno de los días de estudio se sacrificaron los animales mediante decapitación o perfusión (los animales se sometieron a ayuno durante 12 horas antes del sacrificio en el caso de los días 30, 50 y 85). De los animales decapitados se recogió y pesó el cerebro (hipotálamo e hipófisis), la grasa (subcutánea abdominal, visceral perigonadal y parda), las gónadas y el músculo gastrocnemio, congelándolos inmediatamente en nieve carbónica y almacenándolos a -80 °C hasta el momento de su utilización. También se recogió la sangre truncular en tubos con EDTA 0,2 M pH 7,4 manteniéndola en hielo, para posteriormente centrifugar a 15000 rpm durante 20 minutos para quedarnos con el plasma.

Todos los animales de este modelo experimental se mantuvieron y sacrificaron en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de la Universidad Autónoma de Madrid, bajo condiciones constantes de luz-oscuridad, con ciclos de 12 horas, y temperatura (22-24 °C); y se les suministró una dieta estándar *ad libitum* que contenía 16,1% de proteínas, 3,1% de grasas, 60% de carbohidratos y 2,9 kilocalorías/gramo (Panlab, Barcelona, España).

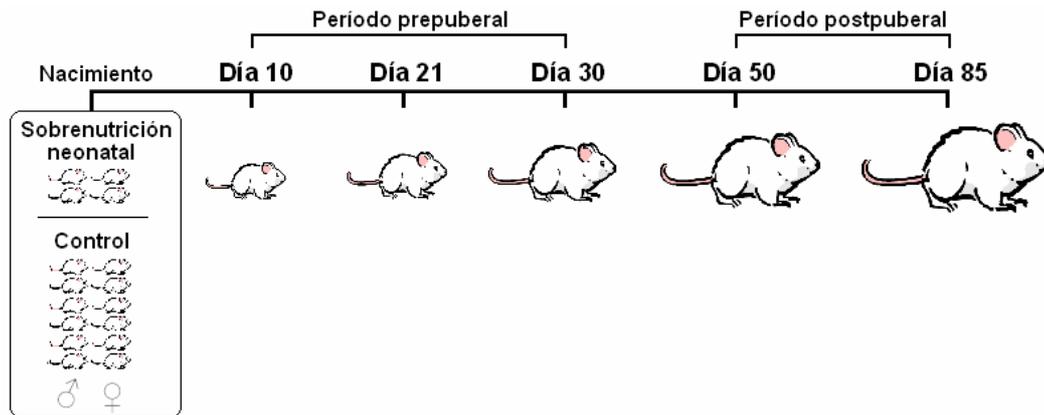


Figura 6. Esquema representativo del modelo fisiológico de sobrepeso durante el desarrollo basado en la sobrenutrición neonatal de ratas Wistar ($n=12$ por grupo experimental – sobrenutrición o control – por sexo por día). Mediciones realizadas: peso, longitud, glucemia e ingesta. Muestras tomadas: hipotálamo, hipófisis, grasa (visceral y subcutánea) y sangre.

1.2. Modelo de sobrepeso prepuberal con administración aguda de leptina

Este modelo se desarrolló teniendo en consideración el dimorfismo sexual de las ratas Wistar en cuanto al comienzo de la pubertad, siendo, aproximadamente, los días 32 y 37 los momentos de comienzo de la misma en hembras y machos, respectivamente [260]. Así pues, se fijaron 3 puntos de estudio prepuberal los días postnatales 21, 30 y 35 (figura 7) con un control del peso, la longitud y la ingesta. En el primero de ellos se estudiaron ambos sexos, mientras que en los otros días sólo se estudió uno de ellos, de forma que se evaluaran las características de nuestro interés justo antes del comienzo de la pubertad. Para ello, en el día 21 (destete) se estabularon los animales en parejas del mismo sexo y se monitorizaron los signos externos indicadores de la entrada en pubertad, esto es, apertura vaginal en hembras y retirada balano-prepucial en machos. A las 09:00h de cada uno de los 3 puntos experimentales se inyectó intraperitonealmente leptina ($3 \mu\text{g/g}$ peso; National Hormone & Pituitary Program, Torrance, CA, USA) o vehículo (suero salino con 0,1% de suero fetal bovino, $10 \mu\text{L/g}$ peso) [261], sacrificando los animales mediante decapitación 45 minutos o 2 horas después en función de los estudios posteriores de señalización intracelular y expresión génica que se iban a realizar (los animales se sometieron a ayuno durante 12 horas antes del sacrificio en el caso de los días 30 y 35). En todos los casos se recogió y pesó el cerebro (hipotálamo e hipófisis), la grasa (subcutánea abdominal, visceral perigonadal y parda), las gónadas y el músculo gastrocnemio, congelándolos inmediatamente en nieve carbónica o nitrógeno líquido y almacenándolos a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su utilización. También se recogió la sangre truncular en tubos con EDTA 0,2 M pH 7,4 manteniéndola en hielo, para posteriormente centrifugar a 15000 rpm durante 20 minutos para quedarnos con el plasma, el cual se congeló a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

Los animales del día postnatal 21 se mantuvieron y sacrificaron en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Los animales de días postnatales 30 y 35 se mantuvieron y sacrificaron en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba. En ambos casos las ratas estuvieron bajo condiciones constantes de luz-oscuridad, con ciclos de 12 horas, y temperatura (22-24 °C); y se les suministró una dieta estándar *ad libitum* que contenía 16,1% de proteínas, 3,1% de grasas, 60% de carbohidratos y 2,9 kilocalorías/gramo (Panlab, Barcelona, España).

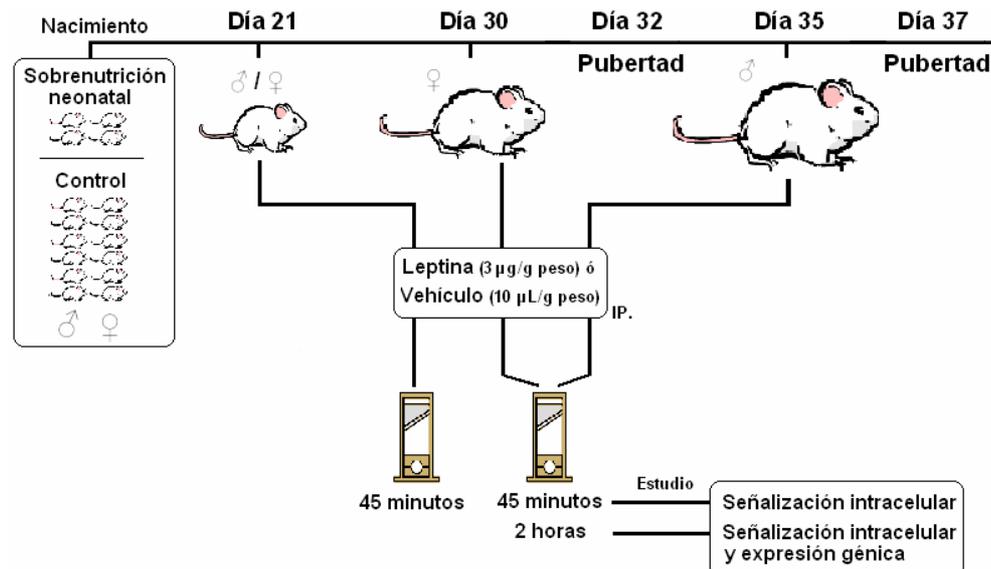


Figura 7. Esquema representativo del modelo fisiológico de sobrepeso prepuberal basado en la sobrenutrición neonatal de ratas Wistar (día 21: n=36 por grupo experimental – sobrenutrición o control – por sexo; días 30 y 35: n=24 por grupo experimental). IP: intraperitoneal. Mediciones realizadas en día 21: peso y longitud. Mediciones realizadas en días 30 y 35: peso, longitud, ingesta y control de signos externos de pubertad. Muestras tomadas en todos los puntos experimentales: hipotálamo, hipófisis (excepto día 21), grasa (visceral, subcutánea y parda), gónadas y sangre.

2. Técnicas analíticas

En cada uno de los dos modelos experimentales se estudiaron diferentes moléculas de especial interés relacionadas con la obesidad, el control homeostático, el desarrollo y la pubertad (figuras 8 y 9). En el plasma se analizaron la leptina, insulina, testosterona y la hormona luteinizante. En el hipotálamo se estudiaron las proteínas relacionadas con la señalización intracelular por leptina, además de la expresión génica de distintos neuropéptidos, hormonas y receptores. Finalmente, en la hipófisis se evaluó la expresión génica de gonadotropinas y de las hormonas del crecimiento y estimulante de la tiroides. Las técnicas empleadas para ello fueron el inmunoensayo múltiple en suspensión, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, el radioinmunoanálisis, el western blotting, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real y la inmunohistoquímica.

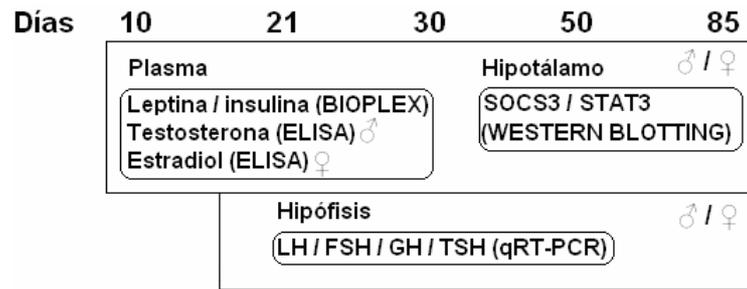


Figura 8. Esquema representativo de las moléculas estudiadas, y las técnicas utilizadas para ello, en plasma, hipotálamo e hipófisis del modelo de sobrepeso durante el desarrollo. BIOPLEX: inmunoensayo múltiple en suspensión; qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real; SOCS3: supresor de la señalización por citoquinas 3; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona folículo estimulante; GH: hormona del crecimiento; TSH: hormona estimulante de la tiroides; Kiss: kisspeptina; GnRH: hormona liberadora de gonadotropina.

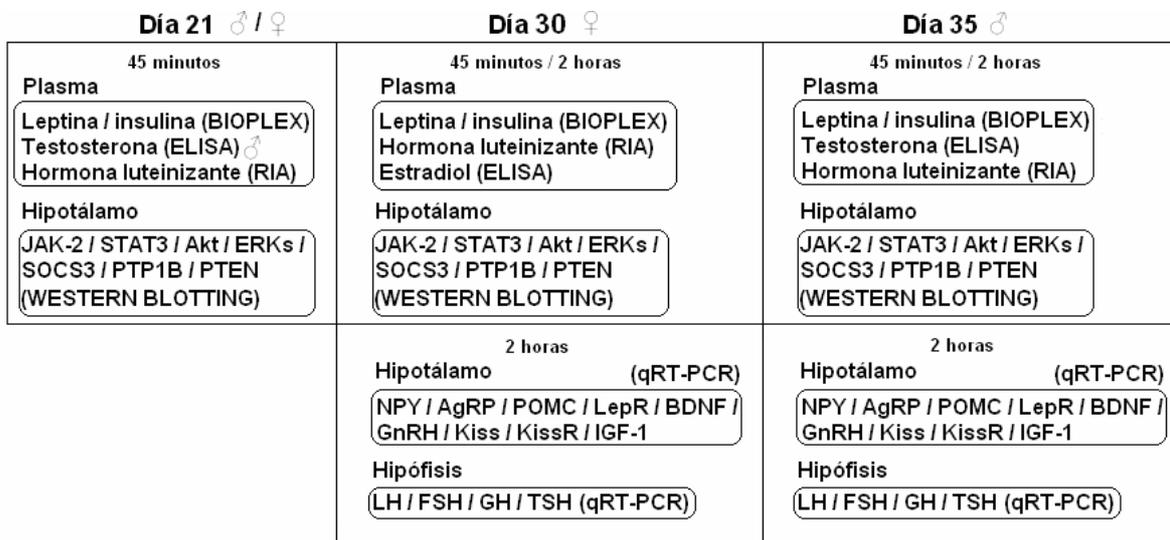


Figura 9. Esquema representativo de las moléculas estudiadas, y las técnicas utilizadas para ello, en el plasma, hipotálamo e hipófisis del modelo de sobrepeso prepuberal con administración aguda de leptina tras 45 minutos o 2 horas. BIOPLEX: inmunoensayo múltiple en suspensión; ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas; RIA: radioinmunoensayo; qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real; JAK-2: Janus quinasa 2; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; Akt: proteína quinasa específica de serina/treonina; ERK: quinasa relacionada con señal extracelular; SOCS3: supresor de la señalización por citoquinas 3; PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B; PTEN: homólogo de la fosfatasa y la tensina; NPY: neuropéptido Y; AgRP: proteína relacionada con Agouti; POMC: pro-opiomelanocortina; LepR: receptor de leptina; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; GnRH: hormona liberadora de gonadotropina; Kiss: kisspeptina; KissR: receptor de kisspeptina; IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina-I; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona folículo estimulante; GH: hormona del crecimiento; TSH: hormona estimulante de la tiroides.

2.1. Inmunoensayo múltiple en suspensión

En los dos modelos experimentales se determinaron las concentraciones plasmáticas de leptina e insulina mediante el uso del kit "MILLIPLEX[®] MAP Rat Serum Adipokine Panel" (Millipore, Billerica, MA, USA). Este ensayo en suspensión está basado en el uso de microesferas para el anclaje de los anticuerpos primarios, las cuales son detectadas individualmente tras su activación por fluorescencia. En cada uno de los inmunoensayos individuales, en este caso leptina e insulina, el anticuerpo de captura se acopla a una microesfera con características únicas, lo que permite que sea discriminada de las otras que forman parte del sistema. Estas microesferas, de poliestireno o látex, tiene un tamaño de entre 3 y 5 micras, y un código de color por medio de dos fluoróforos rojo y naranja, que mezclados en distinta proporción permiten obtener diferentes partículas. Para la realización de esta técnica se agrupan las diferentes microesferas, y se lleva a cabo el inmunoensayo en un vial o en un pocillo de microplaca. Cada una de las reacciones antígeno-anticuerpo se detecta y cuantifica en cada tipo de microesfera con un sistema indicador por fluorescencia. La intensidad de las señales emitidas se mide por citometría de flujo, cuantificando la reacción antígeno-anticuerpo, o lo que es lo mismo, la cantidad de analito capturado en cada microesfera. Cada una de ellas, amén de la cantidad de analito inmovilizado, se identifican según el código de color medido por una segunda señal fluorescente, permitiendo de esta manera la cuantificación simultánea de diferentes moléculas en una sola muestra.

El protocolo que se llevó a cabo para esta técnica fue el proporcionado por la casa comercial. La placa del ensayo se equilibró con 200 μ L de tampón de ensayo (kit comercial) por pocillo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el tampón de ensayo por completo y se añadieron 25 μ L de cada estándar (de 0 a 50.000 pg/mL) o control de calidad interno (con las concentraciones de leptina e insulina que indique el kit) en los pocillos determinados previamente al efecto, siempre por duplicado. A continuación, se añadieron 25 μ L de tampón de ensayo en los pocillos destinados posteriormente a las muestras plasmáticas a evaluar. Después, se añadieron 25 μ L de matriz sérica (kit comercial) a los pocillos de los estándares y controles de calidad, y 25 μ L de plasma en los pocillos apropiados. El siguiente paso fue la adición de 25 μ L de la mezcla de microesferas (leptina e insulina, kit comercial) en cada uno de los pocillos. La placa de ensayo se tapó y se incubó en agitación 16-18 horas a 4 °C. Seguidamente, se eliminó el contenido de los pocillos y se procedió a lavar 3 veces con 200 μ L de tampón de lavado (kit comercial). Una vez eliminado por completo el tampón de lavado, se añadieron en todos los pocillos 50 μ L de disolución con anticuerpos monoclonales conjugados con biotina para leptina e insulina dirigidos frente a determinantes antigénicos diferentes de los acoplados a las microesferas (kit comercial), se cubrió la placa y se incubó en agitación 2 horas a temperatura ambiente, para inmediatamente añadir otros 50 μ L de estreptavidina-ficoeritrina (kit comercial). Se cubrió la

placa y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el contenido de los pocillos y se lavó 3 veces con 200 μ L de "Wash Buffer" por pocillo. Finalmente, y después de vaciar por completo el líquido de los pocillos, se añadieron 100 μ L de tampón necesario para la cuantificación (kit comercial), resuspendiendo las microesferas 5 minutos en agitación para proceder a la determinación de los parámetros de estudio utilizando el "Bio-Plex™ 200 System" y el "Bio-Plex Manager™ Software 4.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). La señal de la ficoeritrina, común para ambas hormonas, se discriminó en función de la señal emitida por las microesferas conjugadas con los anticuerpos para leptina e insulina. El límite de sensibilidad para la leptina y la insulina fue de 0,0097 y 0,0525 ng/mL, respectivamente. El coeficiente de variación intraensayo osciló entre 1,67 y 4,2 %, mientras que el coeficiente de variación interensayo osciló entre 2,83 y 13,55 %.

2.2. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

Las concentraciones plasmáticas de testosterona en los machos de ambos modelos se determinaron mediante el uso del "Rat Testosterone (T) ELISA kit" (CUSABIO BIOTECH, Hubei, China). El protocolo utilizado fue el proporcionado por la casa comercial. Así pues, se valoró la concentración hormonal de todas las muestras en duplicados de 50 μ L estableciendo 6 estándares de concentraciones crecientes entre 0 y 25,6 ng/mL. A continuación, se añadieron 50 μ L de conjugado con peroxidasa de rábano y 50 μ L de anticuerpo anti-testosterona (kit comercial). Se mezcló bien y se incubó 1 hora a 37 °C. Seguidamente, se lavó 3 veces consecutivas con 200 μ L de tampón de lavado (kit comercial), asegurándonos de eliminar éste completamente después de cada lavado. Después, se añadieron 50 μ L de substrato A y otros 50 μ L de substrato B (kit comercial), mezclando bien e incubando 15 minutos a 37 °C. Por último, se añadieron 50 μ L de solución para parar la reacción (kit comercial) y determinar la densidad óptica de las muestras a 450 nm con el espectrofotómetro Infinite M200 (Tecan Group, Salzburgo, Austria). La concentración hormonal se determinó mediante la comparación de la densidad óptica de las muestras con las de la curva estándar. El límite de sensibilidad de esta técnica fue 0,06 ng/mL, mientras que los coeficientes de variabilidad intra- e interensayo fueron <8 y <10 %, respectivamente.

Las concentraciones plasmáticas de estradiol en las hembras del modelo de desarrollo y en las hembras de día 30 del modelo de sobrepeso prepuberal con administración aguda de leptina se determinaron mediante el uso del "Rat Estradiol ELISA kit" (CUSABIO BIOTECH, Hubei, China). El protocolo que se llevó a cabo fue el que la casa comercial proporcionaba junto con el kit. Para ello, se valoró la concentración hormonal de todas las muestras en duplicados de 50 μ L, estableciendo 6 estándares de concentraciones crecientes entre 0 y 0,6 ng/mL. A continuación, se añadieron 50 μ L de conjugado con peroxidasa de rábano y 50 μ L de anticuerpo anti-estradiol (kit comercial). Se mezcló bien y se

incubó 2 horas a 37 °C. Posteriormente, se lavó 3 veces consecutivas con 200 µL de tampón de lavado (kit comercial), asegurándonos de eliminar éste completamente después de cada lavado. Acto seguido, se añadieron 50 µL de substrato A y 50 µL de substrato B (kit comercial), mezclando bien e incubando 15 minutos a 37 °C. Finalmente, se añadieron 50 µL de solución para parar la reacción (kit comercial) y determinar la densidad óptica de las muestras a 450 nm con el espectrofotómetro Infinite M200. La concentración hormonal se determinó mediante la comparación de la densidad óptica de las muestras con las de la curva estándar. El límite de sensibilidad de esta técnica fue 0,015 ng/mL, mientras que los coeficientes de variabilidad intra- e interensayo fueron <15% en ambos casos.

2.3. Radioinmunoensayo

La determinación de las concentraciones plasmáticas de la hormona luteinizante en los animales del modelo de sobrepeso prepuberal con administración aguda de leptina se realizó en el laboratorio del Prof. Tena-Sempere en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba. Para ello, se valoró la hormona de todas las muestras plasmáticas en el mismo ensayo en duplicados de 25 µL utilizando una prueba de doble anticuerpo anti-LH marcado con I¹²⁵ (kit proporcionado por el National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) siguiendo el método desarrollado por Sánchez-Criado y colaboradores [262]. El coeficiente de variación intraensayo fue 8% y la sensibilidad del ensayo fue 3,75 pg por tubo.

2.4. Western blotting

Los hipotálamos analizados mediante esta técnica se procesaron previamente a la misma de diferente manera según el caso. Así pues, los tejidos de los animales del modelo de sobrepeso prepuberal con administración aguda de leptina por 45 minutos y del modelo de sobrepeso durante el desarrollo fueron homogeneizados en 500 µL de buffer de lisis (fosfato sódico 0.1 M, pH 7.4, Triton X-100 20%, dodecil sulfato sódico 10 %, azida sódica 0,5 %, deoxicolato sódico 0.5 %, PMSF 100 mM y una tableta de cocktail de inhibidores de proteasas de Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania; todo en agua destilada) durante 1 minuto utilizando un molino mezclador (MM 400, Retsch, Hann, Alemania). A continuación se centrifugaron los lisados 10 minutos a 14000xg y 4 °C, recogiendo acto seguido el sobrenadante en el que se encuentra la fracción proteica total de las muestras, que se puede congelar a -80 °C hasta su cuantificación.

Los hipotálamos de los animales del modelo de sobrepeso prepuberal con administración de leptina por 2 horas se procesaron empleando el kit “RNeasy Plus Mini” (QIAGEN Iberia, Madrid, España). Esto fue así ya que este kit permite aislar tanto ARN como

proteínas a partir de una misma muestra de tejido con mejor rendimiento que las técnicas habituales, lo que permitió estudiar la señalización intracelular y la expresión génica sin necesidad de utilizar más animales. El protocolo utilizado fue el proporcionado por la casa comercial con la salvedad de varias modificaciones metodológicas. De esta forma, los tejidos se homogeneizaron en 600 μ L de buffer "RLT Plus" (kit comercial) durante 1 minuto utilizando el molino mezclador. A continuación se centrifugaron los lisados 3 minutos a 12000xg, para seguidamente transferir los sobrenadantes a columnas "gDNA Eliminator" (kit comercial) colocadas en tubos de 2 mL y centrifugar 1 minuto a 8000xg. A los filtrados de las columnas se les añadió 1 volumen de etanol al 70% y se mezcló bien por pipeteo. Estas muestras se transfirieron a columnas "RNeasy" (kit comercial) situadas en tubos de 2 mL, y se centrifugaron 1 minuto a 8000xg. En los filtrados de estas columnas está la proteína, que debe ser precipitada para poder cuantificar su concentración. Para ello, las muestras se diluyeron en 4 volúmenes de acetona y se dejaron 30 minutos a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm para eliminar la acetona. Los pellets obtenidos se resuspendieron entre 50 y 200 μ L de tampón CHAPS (urea 7M, thiourea 2M, CHAPS 4% w/v, TRIS 1M 8,8 0,5% v/v en agua destilada) dependiendo de la cantidad de tejido de partida. Estas muestras se pueden congelar a -80 °C hasta su cuantificación.

Para la cuantificación de la concentración de proteínas se utilizó el método de Bradford, basado en el cambio del espectro de absorción del reactivo homónimo al interactuar con las proteínas [263]. Para ello, cada uno de los lisados se diluyó en agua destilada y seguidamente en reactivo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Madrid, España), obteniendo unas concentraciones de fracción proteica de 1:400 con el agua y 1:500 junto con el reactivo. La mezcla se agitó mediante vórtex y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. En paralelo se preparó una curva patrón con concentraciones de 0 a 25 μ g de albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Después se midió la absorbancia a 595 nm con el espectrofotómetro Infinite M200. La concentración proteica se determinó mediante la comparación de la densidad óptica de las muestras con las de la curva estándar.

A partir de la fracción proteica, ya cuantificada, se tomaron cantidades de proteína total de 40 μ g y volúmenes equivalentes de tampón Laemmli 2x o 5x (Tris-HCl 1M pH 6,8, glicerol 25%, SDS 2% y azul de bromofenol 0,01%) dependiendo de la concentración de proteína. Seguidamente se procedió a centrifugar durante 1 minuto (8000 rpm) para mezclar bien la muestra y el tampón. A continuación se desnaturalizaron las muestras durante 5 minutos a 100 °C (termoblocker Eppendorf Thermomixer compact, Hamburgo, Alemania), y nuevamente se centrifugó durante 1 minuto (8000 rpm) para que la condensación se mezcle con la muestra. En este punto las muestras se pueden conservar en hielo o a -20 °C en función de si se va a seguir con la técnica en ese momento o al día siguiente,

respectivamente. El siguiente paso fue la separación electroforética de las muestras en geles de poliacrilamida, en este caso del 10%, en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE (tampón de carrera compuesto por 100 mL Tris-glicina 10X, 10 mL SDS 10% en 1L de agua destilada), a un voltaje constante de 80V durante 15-20 minutos hasta que las muestras quedan alineadas, y posteriormente 140V hasta que las muestras alcanzan el final del gel, aproximadamente 60 minutos. A continuación, se transfirieron las proteínas a membranas de polivinildenedifloride (tampón de transferencia compuesto por 80 mL Tris-glicina 10X, 80 mL metanol en 800 mL de agua destilada) a un amperaje constante de 350mA durante 90 minutos. Se comprobó la eficiencia de la correcta transferencia tiñendo las membranas con el marcador de bandas proteicas rojo Ponceau S (para desteñir las membranas se empleó ácido acético al 10%).

El paso subsiguiente fue el bloqueo de las membranas para que el anticuerpo que se utiliza no se una inespecíficamente a puntos libres de proteína en la membrana. Para ello, se utilizó un tampón de bloqueo con leche desnatada o albúmina sérica bovina (para detectar proteínas fosforiladas) al 5% y 100 mL de TBS-Tween 20 1X (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; NaCl 0,1 M, Tween 20 0,1%) en 1 L de agua destilada; durante un tiempo de 90 minutos en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes a la proteína de interés (tabla 1), diluidos en el tampón de bloqueo pertinente (1:1000), durante toda la noche en agitación a 4 °C. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 15 minutos con tampón TBS-Tween 20 en agitación a temperatura ambiente, y se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios correspondientes (tabla 1) diluidos en tampón de bloqueo con leche desnatada (1:2000), durante 90 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron nuevamente 3 lavados de 15 minutos antes de proceder a revelar las membranas mediante quimioluminiscencia utilizando el kit Immun-Star WesternC (Bio-Rad Laboratorios, Madrid, España), el cual contiene luminol y substratos oxidantes de la peroxidasa de rábano de los anticuerpos secundarios. El revelado y la densitometría cuantificadora de las bandas proteicas inmunoreactivas se realizaron con el “Kodak Gel Logic 1500 Image Analysis System” y el “Molecular Imaging Software 4.0” (Rochester, NY, USA), respectivamente.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de Western blotting. Akt: proteína quinasa específica de serina/treonina; ERK: quinasa relacionada con señal extracelular; GAPDH: gliceraldehído 3-fostato deshidrogenasa; JAK2: Janus quinasa 2; PTEN: homólogo de la fosfatasa y la tensina; PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B; SOCS3: supresor de la señalización por citoquinas 3; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; p-: forma fosforilada.

Antígeno diana	Compañía	Huésped
Akt	Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)	Cabra
p-Akt (Ser473)	Cell Signaling (Boston, MA, USA)	Ratón
ERK 1/2	Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)	Ratón
p-ERK 1/2	Cell Signaling (Boston, MA, USA)	Conejo
GAPDH	Anaspec (San José, CA, USA)	Conejo
JAK2	Millipore (Temecula, CA, USA)	Ratón
p-JAK2	Millipore (Temecula, CA, USA)	Conejo
PTEN	Sigma (St. Louis, MO, USA)	Ratón
p-PTEN	Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)	Conejo
PTP1B	Novus Biologicals (Atlanta, GA, USA)	Conejo
SOCS3	Proteintech (Chicago, IL, USA)	Conejo
STAT3	Cell Signaling (Boston, MA, USA)	Ratón
p-STAT3 (Tyr705)	Cell Signaling (Boston, MA, USA)	Conejo
p-STAT3 (Ser727)	Signalway Antibody (College Park, MD, USA)	Conejo
β -III Tubulina	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)	Ratón

Nota: Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-inmunoglobulina G conjugados con peroxidasa de rábano (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

2.5. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

Los hipotálamos e hipófisis de los animales del modelo de sobrepeso prepuberal con administración aguda de leptina por 45 minutos o 2 horas se procesaron empleando el kit anteriormente mencionado “RNeasy Plus Mini”. El protocolo utilizado fue el proporcionado por la casa comercial con la salvedad de varias modificaciones metodológicas. De esta forma, los tejidos se homogeneizaron en 600 μ L de buffer “RLT Plus” (kit comercial) durante 1 minuto utilizando el molino mezclador. A continuación se centrifugaron los lisados 3 minutos a 12000xg, para seguidamente transferir los sobrenadantes a columnas “gDNA Eliminator” (kit comercial) colocadas en tubos de 2 mL, y centrifugar 1 minuto a 8000xg. A los filtrados de las columnas se les añadió 1 volumen de etanol al 70% y se mezcló bien por pipeteo. Estas muestras se transfirieron a columnas “RNeasy” (kit comercial) situadas en tubos de 2 mL, y se centrifugaron 1 minuto a 8000xg. A continuación, se añadió 700 μ L de buffer “RW1” (kit comercial) en las columnas “RNeasy”, centrifugando 1 minuto a 8000xg para el lavado de las mismas. Seguidamente, se añadió 500 μ L de buffer “RPE” (kit comercial) en las columnas “RNeasy”, realizando dos centrifugaciones seguidas de 1 minuto a 8000xg, cambiando, entre medias, los tubos en los que están depositadas las columnas. Finalmente, se eluyó el ARN colocando las columnas en nuevos tubos, añadiendo 40 μ L de agua estéril libre de RNasas

(Braun Medical, Madrid, España), centrifugando 1 minuto a 8000 rpm y repitiendo, nuevamente, este paso. Estas muestras se pueden congelar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su cuantificación mediante el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Las hipófisis de los animales del modelo de sobrepeso durante el desarrollo se homogeneizaron en 1 mL de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Madrid, España) durante 1 minuto utilizando el molino mezclador. Se dejaron reposar los lisados 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron 10 minutos a $12000\times g$ y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para precipitar los restos sólidos no solubles. Los sobrenadantes se transfirieron a un tubo nuevo, dejándolos reposar 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se procedió a la separación de fases añadiendo 200 μL de cloroformo a cada muestra, agitando vigorosamente con la mano 15 segundos e incubando 15 minutos a temperatura ambiente, para acto seguido, centrifugar 15 minutos a $12000\times g$ y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El siguiente paso fue la precipitación de ARN, recogiendo la fase acuosa en un tubo nuevo y añadiendo un volumen de isopropanol, mezclando por inversión y dejando reposar 10 minutos a temperatura ambiente, para, a continuación, centrifugar 10 minutos a $12000\times g$ y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después se procedió al lavado del ARN, desechando el sobrenadante y lavando el pellet con 1 mL de etanol 75% mediante vortexeo y posterior centrifugación 5 minutos a $7500\times g$ y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por último, se solubilizó el ARN retirando el etanol, dejando secar el pellet 5 minutos a temperatura ambiente y resuspendiéndolo en 20 μL de agua estéril libre de RNasas. Estas muestras se pueden congelar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su cuantificación mediante el espectrofotómetro Nanodrop 1000.

Para la retrotranscripción se utilizaron 2 μg de ARN total (25 μL) y el mismo volumen de reactivos de los kits “Taqman[®] Reverse Transcription Reagents” y “MultiScribe[™] Reverse Transcriptase” (Applied Biosystems, Barcelona, España — AB) de acuerdo al protocolo del fabricante. Este proceso se llevó a cabo en un termociclador “Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler” (Bio-Rad Laboratories, Madrid, España) programado con las siguientes condiciones experimentales: 10 minutos a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 minutos a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ e indefinidamente a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, se añadió 50 μL de agua estéril libre de RNasas a cada uno de los tubos conteniendo los ADNc de las distintas muestras y se procedió a realizar la PCR cuantitativa en tiempo real. Para ello, se utilizó por cada muestra un volumen final de 20 μL , esto es, 9 μL de ADNc, 10 μL del kit “Taqman[®] Universal PCR Master Mix” (AB) y 1 μL del kit “20X Taqman[®] Gene Expression Assay Mix” (AB) que contiene la sonda de hidrólisis del gen que se quiere amplificar, utilizando gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa o fosfoglicerato quinasa 1 como controles (tabla 2). Para la verificación y análisis de este proceso se utilizó un sistema de detección de secuencia “ABI PRISM[®] 7900HT” y el software “7000 System SDS Software” (AB), con las siguientes condiciones experimentales: 40 ciclos de desnaturalización 1 minuto a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, anillamiento 15 segundos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ y elongación 1

minuto a 60 °C, utilizando los fluoróforos FAM/TAMRA. La cuantificación relativa de esta técnica se llevó a cabo mediante el método de Pfaffl [264].

Tabla 2. Sondas de hidrólisis utilizadas en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real. AgRP: proteína relacionada con agouti; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; FSH: hormona folículo estimulante; GAPDH: gliceraldehído 3-fostato deshidrogenasa; GH: hormona del crecimiento; GnRH: hormona liberadora de gonadotropina; IGF-I: factor de crecimiento similar a la insulina-I; Kiss: kisspeptina; KissR: receptor de kisspeptina; LepR: receptor de leptina; LH: hormona luteinizante; NPY: neuropéptido Y; Pgk1: fosfoglicerato quinasa 1; POMC: pro-opiomelanocortina; TSH: hormona estimulante de la tiroides; Rn: intensidad de la señal emitida por el reporter normalizada por la emisión del colorante utilizado como referencia pasiva (ROX).

Sonda	Rn
AgRP	01431703
BDNF	01484924
FSH	01484594
GAPDH	99999916
GH	01495894
GnRH	00562754
IGF-I	99999087
Kiss	00710914
KissR	00576940
LepR	01433205
LH	00563443
NPY	01410145
Pgk1	00821429
POMC	00595020
TSH	00565424

Nota: todas las sondas fueron adquiridas en Applied Biosystems, Barcelona, España.

3. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) de uno, dos o tres factores, según el caso, para evaluar las diferencias significativas entre grupos (tabla 4). Cuando existieron diferencias significativas, el análisis fue seguido por un ANOVA de un factor con un test *post hoc* de Scheffé para hacer comparaciones múltiples de las medias de los grupos. Un valor p menor de 0,05 se consideró significativo en todos los casos. El programa informático utilizado para estos análisis fue el SPSS versión 15.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

Tabla 4. Análisis estadísticos de los resultados de los modelos de sobrepeso durante el desarrollo y en el periodo prepuberal. ANOVA: análisis de la varianza; HOMA-IR: índice de resistencia a la insulina mediante evaluación del modelo homeostático.

Modelo	ANOVA de 3 factores (medidas repetidas)	ANOVA de 3 factores	ANOVA de 2 factores (medidas repetidas)	ANOVA de 2 factores	ANOVA de 1 factor
Sobrepeso durante el desarrollo	Peso, tamaño, ingesta y glucemia	Grasa subcutánea abdominal, insulina, índice HOMA-IR, leptina		Incremento de peso, ingesta total acumulada, grasa visceral perigonadal, testosterona, estradiol, proteínas hipotalámicas, hormonas hipofisarias	
Sobrepeso prepuberal en día 21	Peso, tamaño y glucemia	Hormonas circulantes		Grasas subcutánea abdominal y parda, proteínas hipotalámicas	Grasa visceral perigonadal y gónadas
Sobrepeso prepuberal en día 30		Hormonas circulantes	Peso, longitud e ingesta	Proteínas hipotalámicas	Grasas y gónadas
Sobrepeso prepuberal en día 35		Hormonas circulantes	Peso, longitud e ingesta	Proteínas, neuropéptidos, receptores y hormonas hipotalámicas, hormonas hipofisarias	Grasas y gónadas

III. Resultados

1. Sobrepeso durante el desarrollo

1.1. Efecto de la sobrenutrición neonatal sobre los parámetros morfológicos y la ingesta

El día del nacimiento las ratas repartidas en camadas de 4 ó 12 crías por madre (CM) con igualdad de sexos se organizaron al azar sin diferencias en el peso corporal ni la longitud (peso y longitud de machos 4CM: $5,8 \pm 0,1$ gramos / $4,8 \pm 0,1$ cm; peso y longitud de machos 12CM: $5,9 \pm 0,1$ gramos / $4,8 \pm 0,1$ cm; peso y longitud de hembras 4CM: $5,7 \pm 0,2$ gramos / $4,7 \pm 0,1$ cm; peso y longitud de hembras 12CM: $5,7 \pm 0,1$ gramos / $4,7 \pm 0,0$ cm). Durante el periodo de tiempo estudiado se produjo un efecto sobre el peso corporal del sexo ($p < 0,01$), la nutrición neonatal ($p < 0,01$) y el tiempo ($p < 0,01$), con interacción del sexo y la nutrición neonatal ($p < 0,01$), y del tiempo y la nutrición neonatal ($p < 0,01$) (figura 10). Durante todo el periodo de tiempo estudiado los animales con sobrepeso pesaron más que los controles, excepto en los machos del día 85. En el periodo prepuberal (días 10, 21 y 30) no hubo diferencias significativas entre el peso corporal de ambos sexos, ni en los controles ni en los sobrenutridos. Sin embargo, en el periodo postpuberal (días 50 y 85) los machos control y sobrenutridos pesaron más que las hembras.

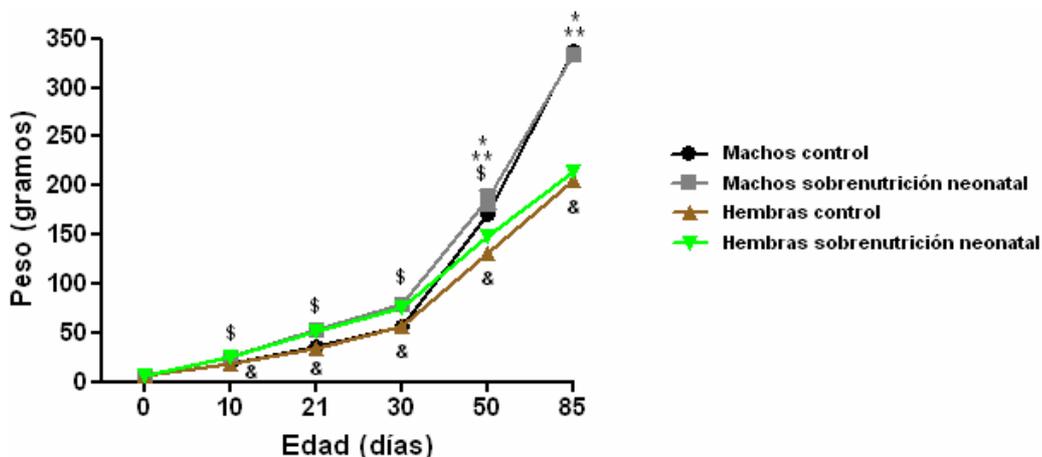


Figura 10. Peso de las ratas durante el desarrollo ($n=12$). Valores representados como media \pm error estándar. * $p < 0,01$ entre sexos (control); ** $p < 0,01$ entre sexos (sobrenutrición); \$: $p < 0,01$ entre machos sobrenutridos y control; &: $p < 0,01$ entre hembras sobrenutridas y control.

El incremento del peso corporal desde el nacimiento hasta el destete se vio afectado por la nutrición neonatal ($p < 0,01$), pero no por el sexo, siendo el incremento mayor en los individuos sometidos a sobrenutrición neonatal respecto a los controles (figura 11.A). Por el contrario, el incremento del peso corporal desde el destete hasta el día 85 estuvo afectado por el sexo ($p < 0,01$), pero no por la nutrición neonatal, siendo éste mayor en los machos de ambos grupos.

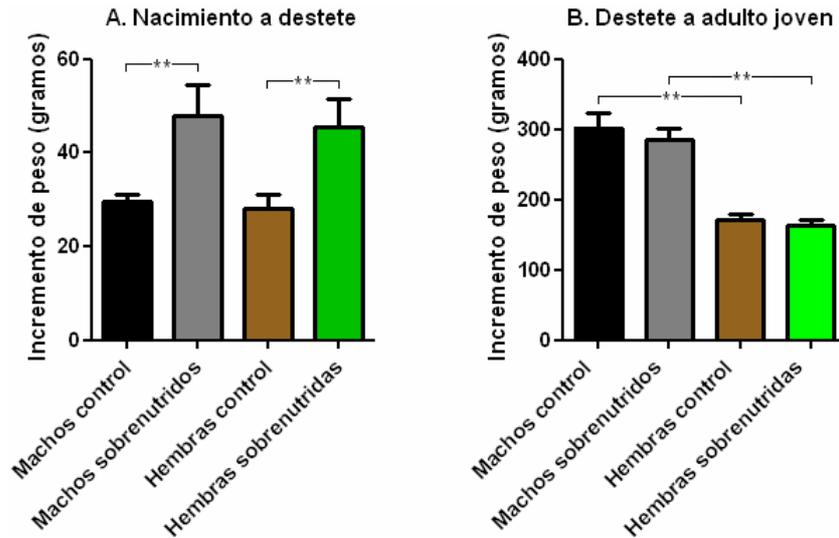


Figura 11. Incremento de peso de las ratas desde el nacimiento hasta el destete en día 21 (A) e incremento de peso de las ratas desde el destete hasta el día 85 (B) (n=12). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p<0,01$.

La longitud corporal también estuvo afectada por el sexo ($p<0,01$), la nutrición neonatal ($p<0,01$) y el tiempo ($p<0,01$), con interacción del sexo y la nutrición neonatal ($p<0,01$), y del tiempo y la nutrición neonatal ($p<0,01$) (figura 12). Durante el periodo prepuberal la longitud no varió significativamente entre sexos en los animales control, pero en los días 50 y 85, ésta fue mayor en los machos (ANOVA $p<0,01$). Los machos con sobrepeso midieron más que sus controles en el día 30 (ANOVA $p<0,01$). La longitud de las hembras con sobrepeso también aumentó progresivamente a lo largo del desarrollo, con una mayor longitud en los días 10, 21 y 50 comparado a sus controles (ANOVA $p<0,01$).

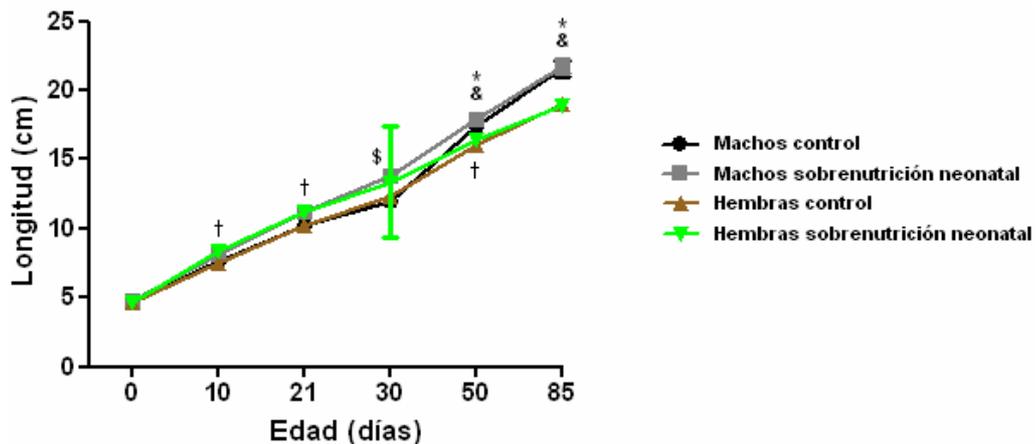


Figura 12. Longitud de las ratas durante el desarrollo (n=12). Valores representados como media \pm error estándar. * $p<0,01$ entre sexos (control); &: $p<0,01$ entre sexos (sobrenutrición); \$: $p<0,01$ entre machos sobrenutridos y control; †: $p<0,01$ entre hembras sobrenutridas y control.

La ingesta, controlada cada 7 días tras el destete, se vio afectada por el sexo ($p<0,01$) y el tiempo ($p<0,01$), con interacción de los dos factores ($p<0,01$) (figura 13). Los machos de los dos grupos comieron más que las hembras durante todo el periodo de tiempo. La ingesta

en los machos control y con sobrepeso aumentó peripuberalmente (14 días después del destete), continuando con su incremento postpuberalmente 21, 35 y 49 días después del destete sólo en los controles, sin más cambios significativos; y manteniéndose sin variaciones significativas en los machos con sobrepeso hasta 42 días tras el destete, en que disminuyó la ingesta, sin más cambios significativos durante el periodo restante.

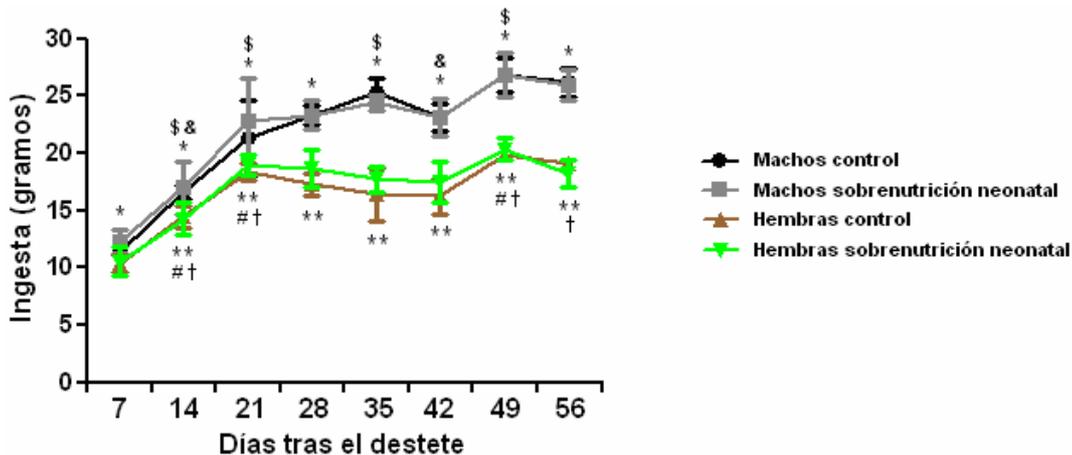


Figura 13. Ingesta de las ratas durante el desarrollo (n=12). Valores representados como media \pm error estándar. * $p < 0,01$ entre sexos (control); ** $p < 0,01$ entre sexos (sobrepeso); \$: $p < 0,01$ respecto al periodo anterior en machos control; &: $p < 0,01$ respecto al periodo anterior en machos con sobrepeso; #: $p < 0,01$ respecto al periodo anterior en hembras con sobrepeso; †: $p < 0,01$ respecto al periodo anterior en hembras con sobrepeso.

La ingesta total acumulada solamente se vio afectada por el sexo ($p < 0,01$), de tal manera que los machos de ambos grupos comieron más que las hembras desde el destete hasta el día postpuberal 85 (figura 14).

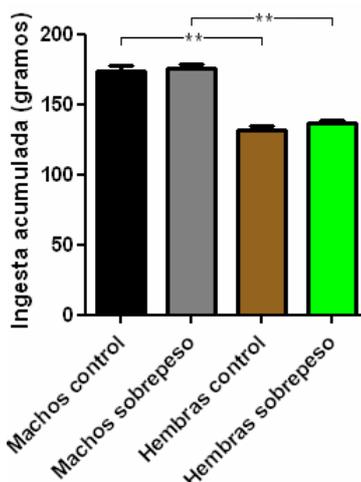


Figura 14. Ingesta total acumulada de las ratas desde el destete (día 21) hasta el día 85 (n=12). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p < 0,01$.

Durante el periodo de tiempo estudiado se produjo un efecto sobre la cantidad relativa de grasa subcutánea abdominal del sexo ($p<0,01$), la nutrición neonatal ($p<0,01$) y el tiempo ($p<0,01$), con interacción del sexo y la nutrición neonatal ($p<0,05$), y del tiempo y la nutrición neonatal ($p<0,05$) (figura 15). No hubo diferencias significativas entre sexos en los controles, a excepción del día postpuberal 85, donde la cantidad relativa de grasa subcutánea fue mayor en los machos (ANOVA $p<0,01$). En los animales con sobrepeso la cantidad relativa de grasa subcutánea fue mayor en las hembras en el día prepuberal 10 y mayor en los machos en el día postpuberal 85 (ANOVA $p<0,01$), mientras que en el resto de puntos temporales no hubo diferencias significativas entre sexos. La grasa subcutánea relativa en los machos control disminuyó en el día prepuberal 21, volviendo a aumentar en el día postpuberal 85. Los machos con sobrepeso tenían más grasa subcutánea relativa en los días 10 y 21 (ANOVA $p<0,01$).

La grasa subcutánea relativa en las hembras control disminuyó en el día prepuberal 21 y posteriormente en el día postpuberal 50. Las hembras con sobrepeso tenían más grasa subcutánea relativa en los días 10 y 21 (ANOVA $p<0,01$). Los valores referentes a la cantidad total de grasa subcutánea en ambos sexos se muestran en la tabla 5.

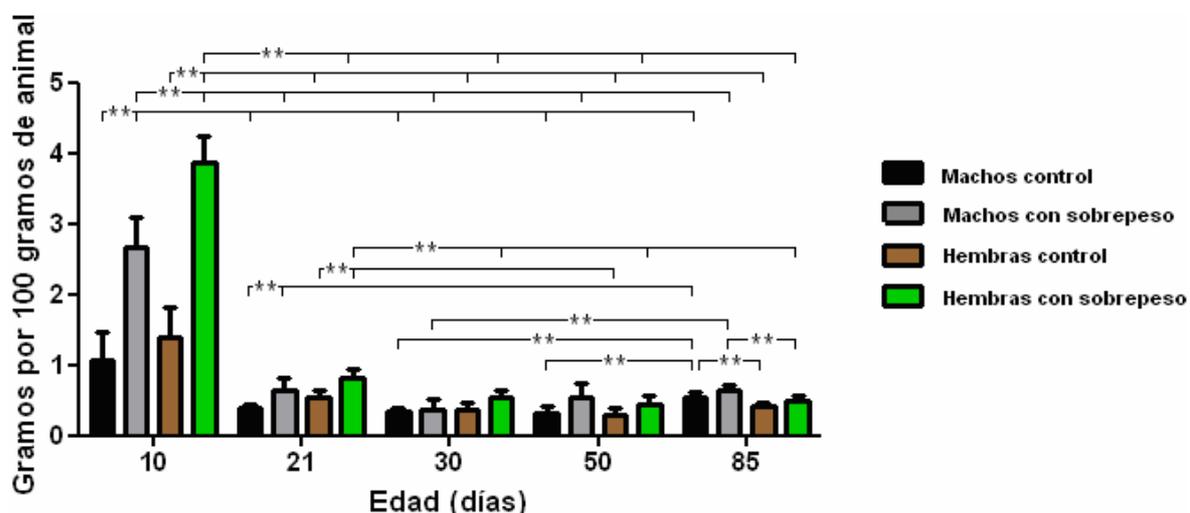


Figura 15. Grasa subcutánea abdominal de las ratas durante el desarrollo (n=12). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p<0,01$.

Tabla 5. Grasa subcutánea abdominal total (en gramos) de las ratas macho y hembra durante el desarrollo (n=12). Valores representados como media \pm error estándar.

Día	Machos control	Machos sobrepeso	Hembras control	Hembras sobrepeso
10	0,2 \pm 0,0	0,7 \pm 0,1 ^b	0,3 \pm 0,0 ^a	1,0 \pm 0,0 ^{ab}
21	0,1 \pm 0,0 ^c	0,4 \pm 0,0 ^{bc}	0,2 \pm 0,0 ^{ac}	0,4 \pm 0,0 ^{bc}
30	0,2 \pm 0,0 ^c	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0 ^b
50	0,5 \pm 0,0 ^c	1,0 \pm 0,3 ^{bc}	0,3 \pm 0,0 ^{ac}	0,7 \pm 0,1 ^{bc}
85	1,9 \pm 0,2 ^c	2,2 \pm 0,3 ^c	0,8 \pm 0,0 ^{ac}	1,1 \pm 0,2 ^{abc}

^a p<0,01 entre sexos de la misma condición nutricional; ^b p<0,01 comparado con los controles; ^c p<0,01 respecto a la edad anterior.

En los machos la cantidad relativa de grasa visceral perigonadal se vio afectada por el tiempo (p<0,01) y la nutrición neonatal (p<0,05), con una interacción entre ambos factores (p<0,05) (figura 16.A). La grasa visceral relativa en los controles aumentó en el día prepuberal 30 y posteriormente también en los días postpuberales 50 y 85. Los machos con sobrepeso tenían más grasa visceral relativa en el día prepuberal 21 (ANOVA p<0,05).

La cantidad relativa de grasa visceral perigonadal en las hembras también se vio afectada por el tiempo (p<0,01) y la nutrición neonatal (p<0,05), con una interacción entre ambos factores (p<0,05) (figura 16.B). La grasa visceral relativa en los controles aumentó en el día prepuberal 30, así como en los días postpuberales 50 y 85. Las hembras con sobrepeso tenían más grasa visceral relativa en el día prepuberal 21 (ANOVA p<0,05). La cantidad total de grasa visceral perigonadal de ambos sexos se muestra en la tabla 6.

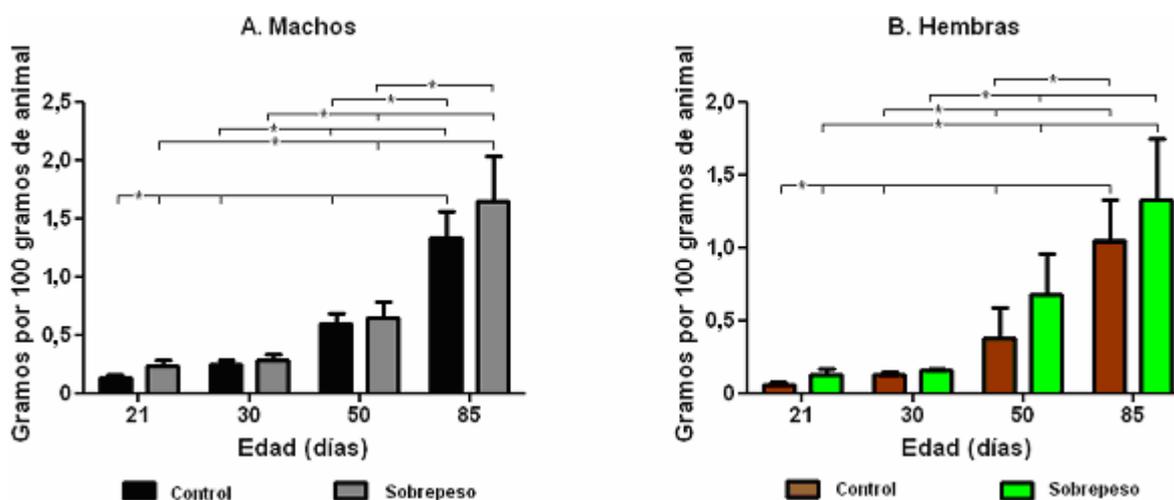


Figura 16. Grasa visceral perigonadal de las ratas durante el desarrollo (n=12). Valores representados como media \pm error estándar. * p<0,05.

Tabla 6. Grasa visceral perigonadal total (en gramos) de las ratas macho y hembra durante el desarrollo (n=12). Valores representados como media \pm error estándar.

Día	Machos control	Machos sobrepeso	Hembras control	Hembras sobrepeso
21	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0 ^a
30	0,1 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,0 ^b	0,4 \pm 0,0 ^{ab}
50	1,0 \pm 0,1 ^b	1,2 \pm 0,2 ^b	0,3 \pm 0,1	1,1 \pm 0,3 ^{ab}
85	4,5 \pm 0,9 ^b	5,7 \pm 1,6 ^b	2,1 \pm 0,0 ^b	2,9 \pm 0,9 ^b

^a p<0,01 comparado con los controles; ^b p<0,01 respecto a la edad anterior.

1.2. Efecto de la sobrenutrición neonatal y el consiguiente desarrollo de sobrepeso sobre la glucemia y los niveles hormonales circulantes

La glucemia durante el periodo de tiempo estudiado se vio afectada por la nutrición neonatal (p<0,01) y el tiempo (p<0,01), con interacción entre los dos factores (p<0,01) (figura 17). La concentración de glucosa en los machos control disminuyó en el día prepuberal 30, sin cambios significativos en el periodo postpuberal. La glucemia en los machos con sobrepeso fue más elevada que en sus controles en los días 10 y 21 (ANOVA p<0,01).

La glucemia en las hembras control y con sobrepeso disminuyó progresivamente en los días 21, 30 y 50, sin más cambios significativos en el día 85. En las hembras con sobrepeso la concentración de glucosa fue mayor que en sus controles los días 10, 21, 30 y 50 (ANOVA p<0,01).

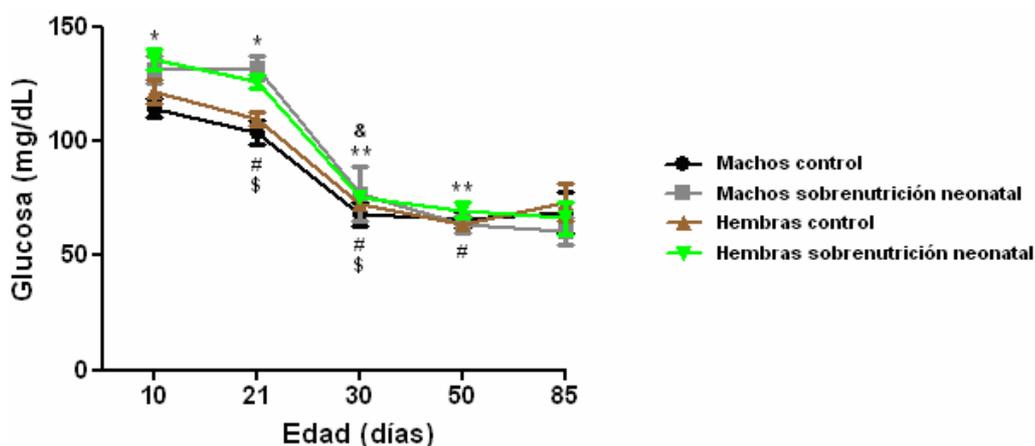


Figura 17. Glucemia de las ratas macho y hembra durante el desarrollo (n=12). Valores representados como media \pm error estándar. * p<0,01 entre animales con sobrepeso y controles de ambos sexos; ** p<0,01 entre hembras con sobrepeso y controles; #: p<0,01 respecto a la edad anterior en hembras control; \$: p<0,01 respecto a la edad anterior en hembras con sobrepeso; &: p<0,01 respecto a la edad anterior en machos control y con sobrepeso.

A lo largo del desarrollo la concentración de insulina se vio afectada por el sexo (p<0,01), la nutrición neonatal (p<0,01) y el tiempo (p<0,01), con la existencia de una interacción entre el sexo y la nutrición neonatal (p<0,01), y del tiempo y la nutrición neonatal

($p < 0,01$) (figura 18). En los controles no hubo diferencias significativas entre sexos, a excepción del día postpuberal 50, donde la concentración de insulina fue mayor en los machos (ANOVA $p < 0,01$). En las ratas con sobrepeso la concentración de insulina no presentó diferencias significativas entre sexos, excepto en el día prepuberal 10, en el que la concentración de insulina en los machos fue mayor (ANOVA $p < 0,01$). En los machos control la concentración de la hormona disminuyó en el día prepuberal 30, manteniéndose sin cambios significativos en el día 50 y aumentando en el día 85. Los machos con sobrepeso tenían más insulina circulante en el día prepuberal 10 comparado con los controles.

La concentración de insulina en las hembras control también disminuyó en el día prepuberal 30 e incrementó en el día postpuberal 85. La insulinemia en las hembras con sobrepeso fue mayor que los controles en los días prepuberales 10 y 21 (ANOVA $p < 0,01$).

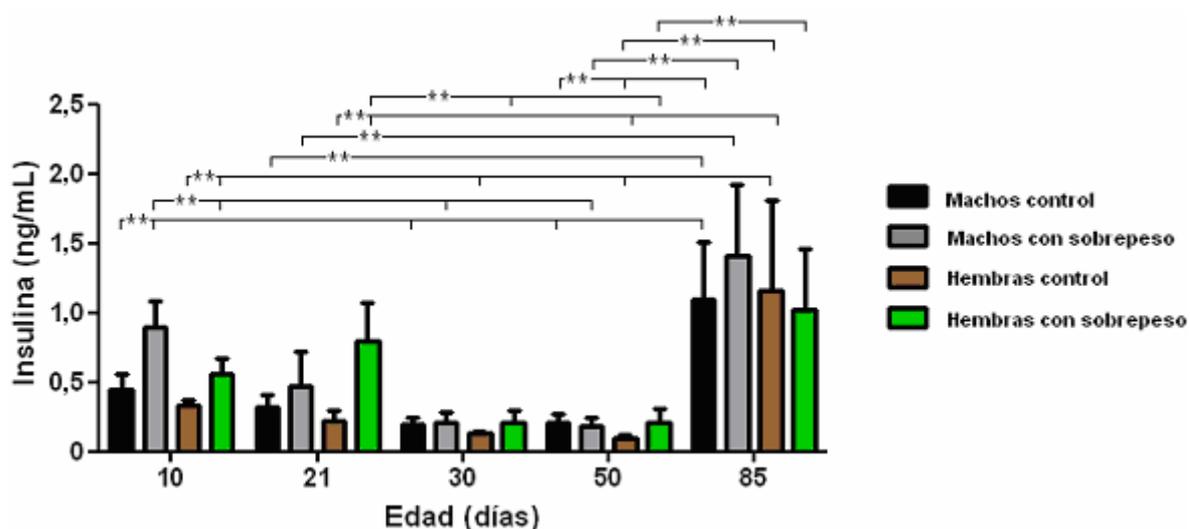


Figura 18. Insulina circulante en las ratas durante el desarrollo ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p < 0,01$.

El índice de resistencia a la insulina mediante evaluación del modelo homeostático (HOMA-IR; $[\text{Glucosa (mmol/L)} \times \text{insulina (mU/mL)}] / 22,5$) se vio afectado por el sexo ($p < 0,01$), la nutrición neonatal ($p < 0,01$) y el tiempo ($p < 0,01$), con una interacción entre el sexo y la nutrición neonatal ($p < 0,01$), y el tiempo y la nutrición neonatal ($p < 0,01$) (figura 19). En los controles no hubo diferencias significativas entre sexos en ningún punto del desarrollo. En las ratas con sobrepeso este índice sólo varió entre sexos en el día prepuberal 10, siendo mayor en los machos (ANOVA $p < 0,01$). En los machos control este índice disminuyó en el día prepuberal 30, volviendo a incrementar en el día postpuberal 85. El índice de resistencia a insulina en los machos con sobrepeso fue mayor que los controles en el día prepuberal 10 (ANOVA $p < 0,01$).

El HOMA-IR en las hembras control disminuyó en los días prepuberales 21 y 30, sin cambios significativos en el día 50, pero aumentando en el día 85. En las hembras con sobrepeso el índice fue mayor en el día 21 (ANOVA $p < 0,01$).

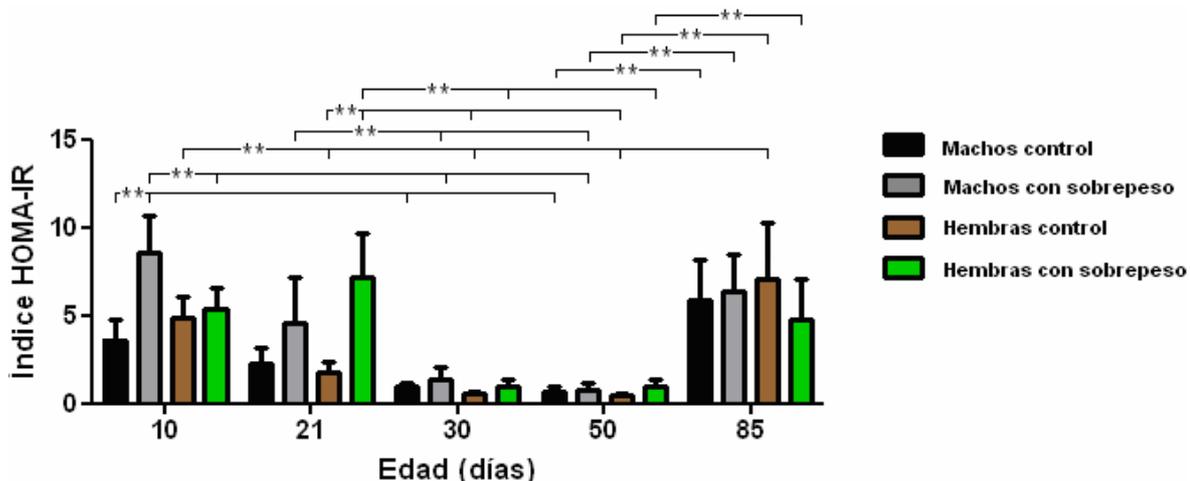


Figura 19. Índice de resistencia a la insulina mediante evaluación del modelo homeostático (HOMA-IR) en las ratas durante el desarrollo ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p < 0,01$.

Los niveles de leptina en las ratas se vieron afectados por el sexo ($p < 0,05$), la nutrición neonatal ($p < 0,05$) y el tiempo ($p < 0,01$), con la existencia de una interacción entre el sexo y la nutrición neonatal ($p < 0,05$) (figura 20). En los animales control no hubo diferencias significativas entre sexos en ningún punto experimental, excepto en el día 85 donde los machos tenían más leptina circulante (ANOVA $p < 0,05$). En los animales con sobrepeso no hubo diferencias significativas entre sexos en ningún punto experimental del desarrollo. La leptinemia en los machos control disminuyó en el día prepuberal 30, incrementando en los dos puntos experimentales del periodo postpuberal. No hubo diferencias significativas en los machos con sobrepeso.

En los dos grupos de machos no hubo correlación entre el peso corporal y la concentración de leptina. Sin embargo, en ambos grupos existió una correlación positiva entre la grasa subcutánea abdominal relativa y la concentración de leptina ($R = 0,67$; $p < 0,01$; $R = 0,57$; $p < 0,01$; en machos control y con sobrepeso, respectivamente). Además, hubo una correlación positiva entre la grasa visceral perigonadal relativa y la leptina circulante solamente en los machos control ($R = 0,44$; $p < 0,05$).

La leptina circulante en las hembras control disminuyó en el día prepuberal 30, sin cambios significativos en el día postpuberal 50, pero aumentando en el día 85. No hubo diferencias significativas en las hembras con sobrepeso.

En las hembras control y con sobrepeso no hubo correlación entre el peso corporal y la concentración de leptina, ni tampoco entre la grasa visceral perigonadal relativa y la concentración de leptina. Sí existió una correlación positiva en los dos grupos entre la grasa subcutánea abdominal relativa y la leptina circulante ($R = 0,49$; $p < 0,05$; $R = 0,52$; $p < 0,01$; en hembras control y con sobrepeso, respectivamente).

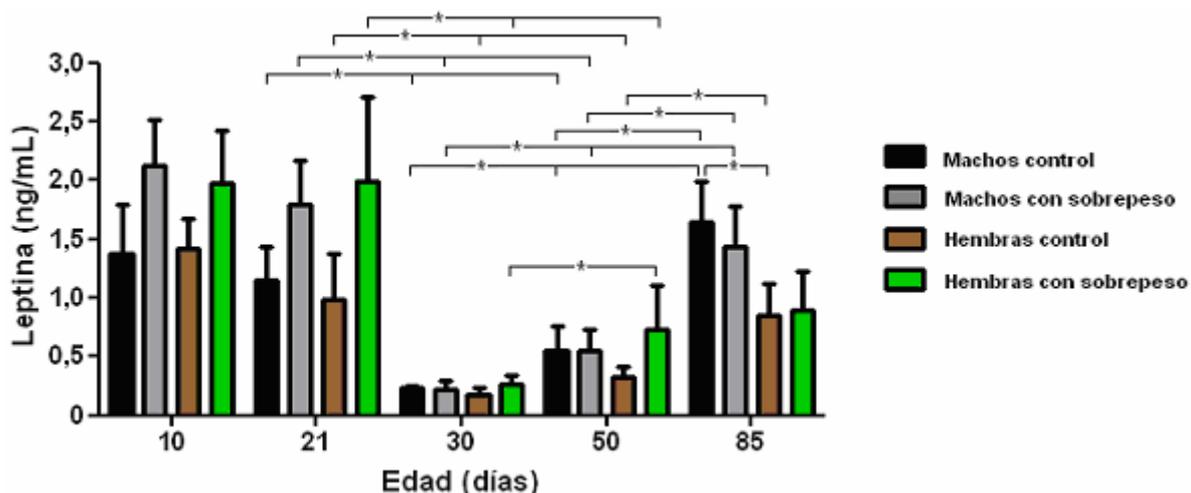


Figura 20. Leptina circulante en las ratas durante el desarrollo ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. * $p < 0,05$.

La concentración de testosterona a lo largo del desarrollo de los machos estuvo afectada por el tiempo ($p < 0,05$) y la nutrición neonatal ($p < 0,05$), con interacción de ambos factores ($p < 0,05$) (figura 21). En los controles aumentó la hormona el día prepuberal 21, sin más cambios significativos en el tiempo debido a la variabilidad que se dio en el periodo postpuberal. La testosterona en los machos con sobrepeso fue mayor solamente en el día prepuberal 10 (ANOVA $p < 0,05$).

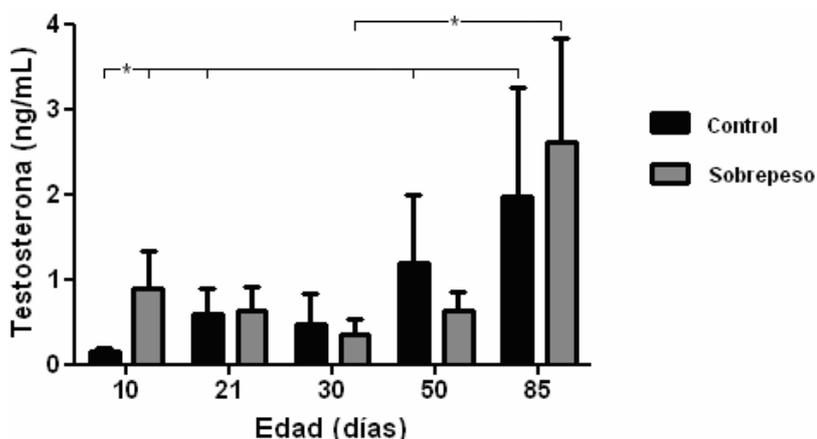


Figura 21. Testosterona circulante en las ratas macho durante el desarrollo ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. * $p < 0,05$.

Los niveles de estradiol en las hembras a lo largo de los días 30, 50 y 85 se vieron afectados por el tiempo ($p < 0,01$) y la nutrición neonatal ($p < 0,05$), con interacción entre ambos factores ($p < 0,05$) (figura 22). En los controles aumentó el estradiol en el día 50, sin cambios significativos en el día 85. El estradiol circulante en las hembras con sobrepeso estaba más elevado en el día prepuberal 30 (ANOVA $p < 0,05$). Los datos referentes a los días 10 y 21 no se muestran debido a que estuvieron por debajo del límite de detección de la prueba analítica (0,015 ng/mL).

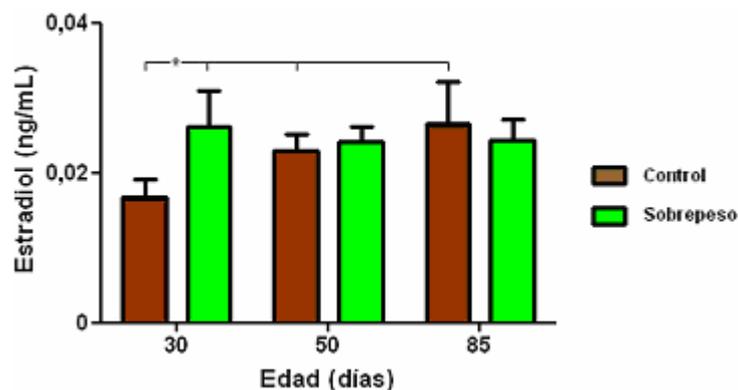


Figura 22. Estradiol circulante en las ratas hembra durante el desarrollo ($n=4$). Valores representados como media \pm error estándar. * $p < 0,05$.

1.3. Efecto de la sobrenutrición neonatal y el consiguiente desarrollo de sobrepeso sobre las proteínas STAT3 y SOCS3 en el hipotálamo

Los niveles basales relativos de STAT3 fosforilado en tirosina 705 en los machos estuvieron afectados por el tiempo ($p < 0,01$) y la nutrición neonatal ($p < 0,05$), sin interacción entre ellos (figura 23.A). La cantidad de p-STAT3 disminuyó en los controles y en los machos con sobrepeso en el día prepuberal 30, sin más cambios significativos en el periodo postpuberal. No hubo efecto del tiempo ni de la nutrición neonatal sobre los niveles basales totales de STAT3 (figura 23.B). Los niveles basales relativos de SOCS3 se vieron afectados por el tiempo ($p < 0,01$) y la nutrición neonatal ($p < 0,05$), sin interacción entre ellos (figura 23.C). Esta proteína disminuyó en los controles y en los machos con sobrepeso en el día prepuberal 21 y seguidamente en el periodo postpuberal.

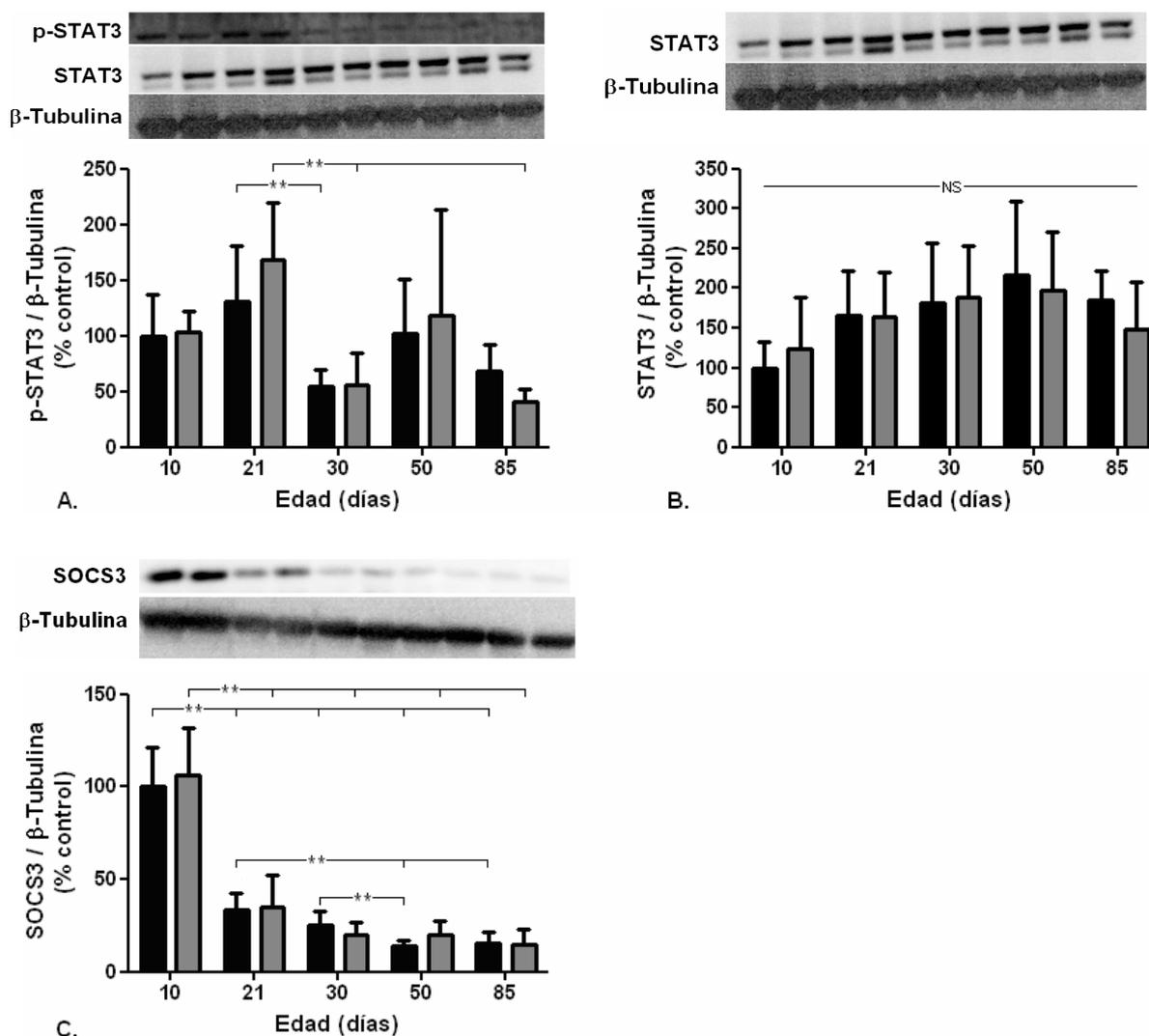


Figura 23. Niveles proteicos relativos en el hipotálamo de ratas macho durante el desarrollo (n=5). Valores representados como media \pm error estándar. A) STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3) fosforilado en tirosina 705; B) STAT3 total; C) SOCS3: supresor de la señalización por citoquinas 3; p-: forma fosforilada; ■ control; ■ sobrepeso; * $p < 0,01$.

La cantidad basal relativa de STAT3 fosforilado en tirosina 705 durante el desarrollo de las hembras estuvo afectada por el tiempo ($p < 0,01$) y la nutrición neonatal ($p < 0,01$), con interacción entre los dos factores ($p < 0,05$) (figura 24.A). En las hembras con normopeso pSTAT3 disminuyó en el día prepuberal 21, aumentando en el día 30 y volviendo a disminuir en el periodo postpuberal. En las hembras con sobrepeso esta proteína presentó una mayor cantidad relativa respecto a los controles en los días prepuberales 10 y 30 (ANOVA $p < 0,01$). No hubo efecto del tiempo ni de la nutrición neonatal sobre los niveles basales totales de STAT3 (figura 23.B). La cantidad basal de proteína SOCS3 estuvo afectada durante el desarrollo por el tiempo ($p < 0,01$) y la nutrición neonatal ($p < 0,01$), con una interacción entre ambos factores ($p < 0,01$) (figura 24.B). La proteína SOCS3 en las hembras control disminuyó en el día 21 y en el periodo postpuberal. En las hembras con sobrepeso SOCS3 estaba presente en mayor cantidad en los días 21, 50 y 85 (ANOVA $p < 0,01$).

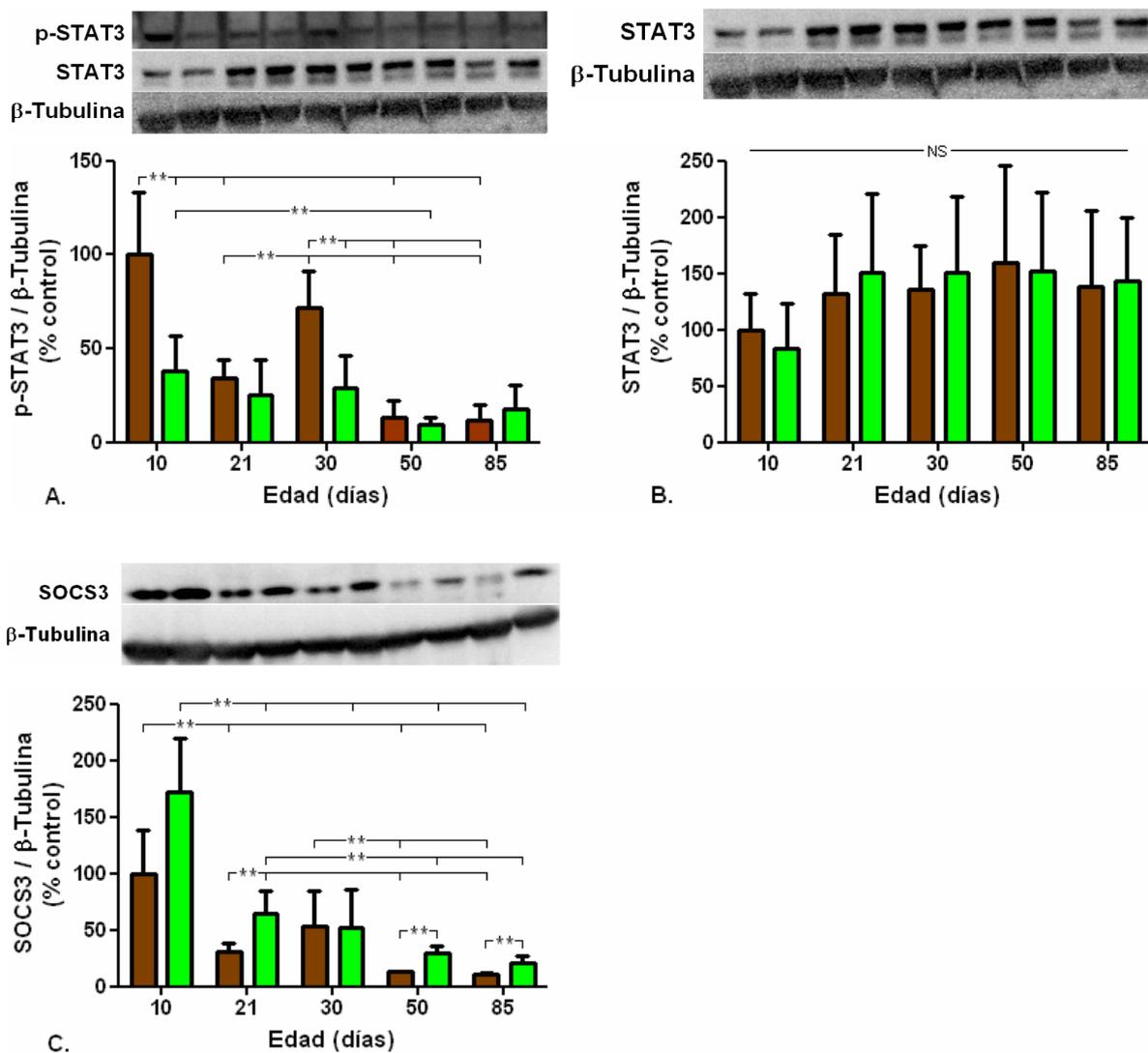


Figura 24. Niveles proteicos relativos en hipotálamo de ratas hembra durante el desarrollo (n=5). Valores representados como media \pm error estándar. A) STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3) fosforilado en tirosina 705; B) STAT3 total; C) SOCS3: supresor de la señalización por citoquinas 3; p-: forma fosforilada; \square control; \blacksquare sobrepeso; ** $p < 0,01$.

1.4. Efecto de la sobrenutrición neonatal y el consiguiente desarrollo de sobrepeso sobre la expresión génica en la hipófisis

- Hormona luteinizante:

Los niveles de ARNm para la hormona luteinizante en los machos se vieron afectados por el tiempo ($p < 0,01$) y la nutrición neonatal ($p < 0,05$), con interacción entre ambos factores ($p < 0,05$) (figura 25.A). En los controles estos niveles incrementaron en el día 30 y en el 50, disminuyendo en el día 85. En los machos con sobrepeso el ARNm de la hormona luteinizante estuvo presente en mayor cantidad en el día postpuberal 50 comparado con los controles (ANOVA $p < 0,01$).

El tiempo ($p<0,01$) y la camada ($p<0,05$) ejercieron un efecto sobre la cantidad relativa de ARNm de la hormona luteinizante en las hembras, con interacción entre los dos factores ($p<0,05$) (figura 25.B). En los días 30 y 50 disminuyó el ARNm en las hembras control, sin más cambios significativos en el día 85. En las hembras con sobrepeso la cantidad relativa de ARNm fue inferior en el día prepuberal 21 comparado con los controles (ANOVA $p<0,05$).

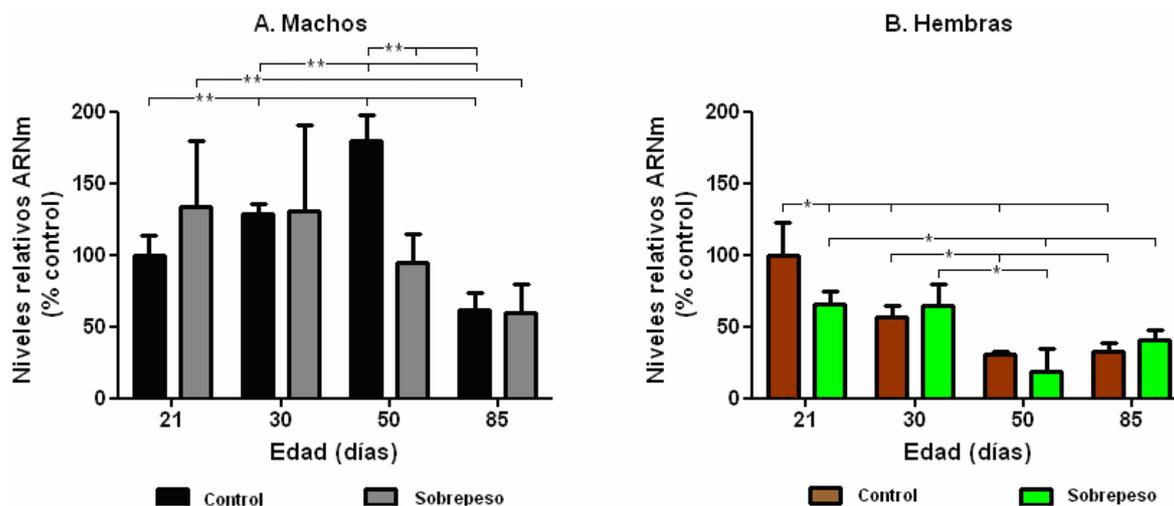


Figura 25. Niveles relativos de ARNm de la hormona luteinizante en la hipófisis de las ratas macho (A) y hembras (B) durante el desarrollo (n=6). Valores representados como media \pm error estándar. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

- Hormona folículo estimulante:

Los niveles de ARNm en los machos se vieron afectados por el tiempo ($p<0,05$) (figura 26.A). En los controles estos niveles no presentaron variaciones en el periodo prepuberal, incrementando en el día 50 y disminuyendo en el día 85. En los machos con sobrepeso se dio un patrón similar, sin diferencias significativas a lo largo del desarrollo.

En las hembras, el tiempo ($p<0,05$) y la camada ($p<0,05$) ejercieron un efecto sobre la cantidad relativa de ARNm de esta hormona, con interacción entre ambos factores ($p<0,05$) (figura 26.B). En el periodo prepuberal de las hembras control no hubo diferencias significativas, disminuyendo en el día postpuberal 50. En las hembras con sobrepeso los niveles relativos de ARNm fueron inferiores a los controles en el día prepuberal 21 (ANOVA $p<0,05$).

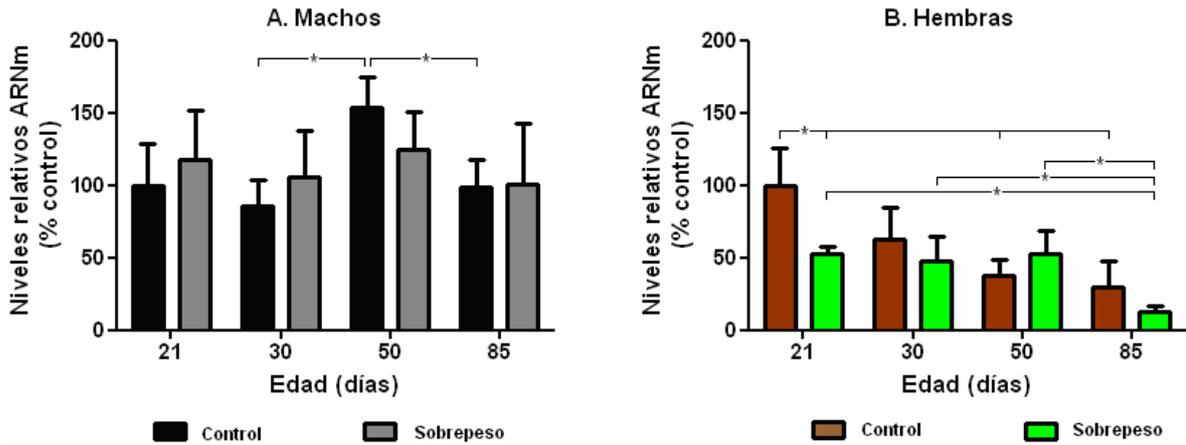


Figura 26. Niveles relativos de ARNm de la hormona folículo estimulante en la hipófisis de ratas macho (A) y hembra (B) durante el desarrollo (n=6). Valores representados como media \pm error estándar. * $p < 0,05$.

- Hormona del crecimiento:

Los niveles de ARNm en los machos se vieron afectados por el tiempo ($p < 0,05$). En los machos control y con sobrepeso no hubo cambios significativos hasta el día 85, en el que disminuyó en ambos grupos la cantidad de ARNm de la hormona de crecimiento (figura 27.A).

El tiempo ($p < 0,05$) ejerció un efecto sobre la cantidad de ARNm en las hembras (figura 27.B). En las hembras control y con sobrepeso no hubo cambios significativos a lo largo del desarrollo, excepto en el día postpuberal 85 donde aumentó la cantidad de ARNm de la hormona de crecimiento, siendo significativo en los controles.

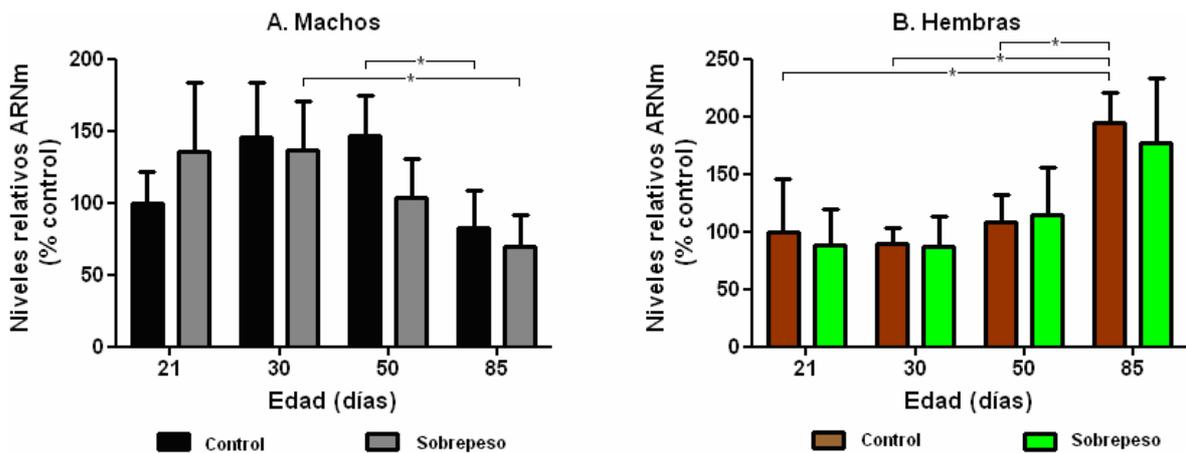


Figura 27. Niveles relativos de ARNm de la hormona del crecimiento en la hipófisis de ratas macho (A) y hembra (B) durante el desarrollo (n=6). Valores representados como media \pm error estándar. * $p < 0,05$.

- Hormona estimulante de la tiroides:

En los machos los niveles relativos de ARNm de la hormona estimulante de la tiroides se vieron afectados por el tiempo ($p < 0,01$) y por la nutrición neonatal ($p < 0,01$), con interacción de ambos factores ($p < 0,01$) (figura 28.A). En los machos con normopeso los niveles de ARNm disminuyeron entre los días 21 y 30, permaneciendo sin cambios significativos en el resto de puntos experimentales. Los machos con sobrepeso tuvieron más cantidad relativa de ARNm en el día postpuberal 50 (ANOVA $p < 0,01$).

En las hembras, el tiempo y la nutrición neonatal no tuvieron un efecto sobre la cantidad relativa de ARNm (figura 28.B).

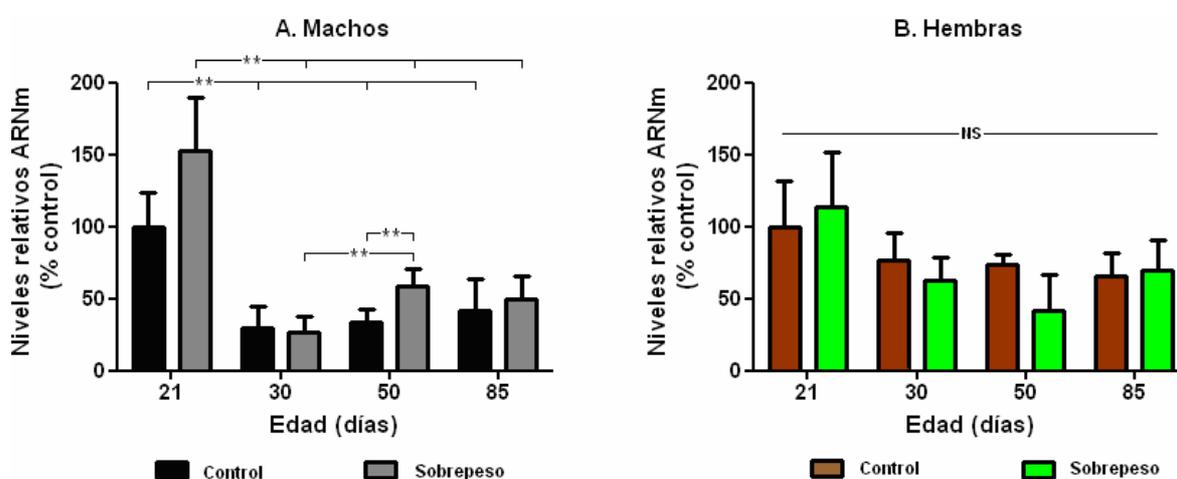


Figura 28. Niveles relativos de ARNm de la hormona estimulante de la tiroides en la hipófisis de ratas macho (A) y hembra (B) durante el desarrollo ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p < 0,01$; NS: no significativo.

1.5. Resumen de los efectos de la sobrenutrición neonatal en el modelo de sobrepeso durante el desarrollo

En las tablas 7 y 8 se muestra un resumen de los efectos producidos por la sobrenutrición neonatal, con el consiguiente desarrollo de sobrepeso, en ambos sexos y en todos los puntos experimentales del presente modelo animal.

Tabla 7. Efectos sexualmente dimórficos de la sobrenutrición neonatal en cada uno de los puntos experimentales del modelo de sobrepeso durante el desarrollo. C: control; S: sobrenutrición neonatal; HOMA-IR: índice de resistencia a la insulina mediante evaluación del modelo homeostático; >M: mayor en los machos; >H: mayor en las hembras; = sin cambios significativos entre sexos.

Día	10		21		30		50		85	
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
Parámetro / Nutrición										
Peso	=	=	=	=	=	=	>M	>M	>M	>M
Incremento de peso			=	=					>M	>M
Longitud	=	=	=	=	=	=	>M	>M	>M	>M
Ingesta acumulada									>M	>M
Grasa subcutánea abdominal relativa	=	>H	=	=	=	=	=	=	>M	>M
Glucosa	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Insulina	=	>M	=	=	=	=	=	=	=	=
HOMA-IR	=	=	=	=	=	=	=	>H	>H	=
Leptina	=	=	=	=	=	=	=	=	>M	=

Tabla 8. Efectos de la sobrenutrición neonatal en cada uno de los puntos experimentales del modelo de sobrepeso durante el desarrollo. M: machos; H: hembras; HOMA-IR: índice de resistencia a la insulina mediante evaluación del modelo homeostático; p-STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3 (fosforilado); SOCS3: supresor de la señalización por citoquinas 3; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona foliculo estimulante; GH: hormona del crecimiento; TSH: hormona estimulante de la tiroides; ↑ incremento respecto al control; ↓ disminución respecto al control; = sin cambios significativos.

Día	10		21		30		50		85	
	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H
Parámetro / Sexo										
Peso	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Incremento de peso			↑	↑					=	=
Longitud	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Ingesta					=	=	=	=	=	=
Grasa subcutánea abdominal relativa	↑	↑	↑	↑	=	=	=	=	=	↑
Grasa visceral perigonadal relativa			↑	↑	=	=	=	=	=	=
Glucosa	↑	↑	↑	↑	=	↑	=	↑	=	=
Insulina	↑	↑	=	↑	=	=	=	=	=	=
HOMA-IR	↑	=	=	↑	=	=	=	↑	=	↓
Leptina	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Testosterona	↑		=		=		=		=	
Estradiol					↑		=		=	
p-STAT3 tirosina 705	=	↓	=	=	=	↓	=	=	=	=
STAT3 total	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
SOCS3	=	=	=	↑	=	=	=	↑	=	↑
LH			=	↓	=	=	↓	=	=	=
FSH			=	↓	=	=	=	=	=	=
GH			=	=	=	=	=	=	=	=
TSH			=	=	=	=	↑	=	=	=

2. Administración aguda de leptina en animales con sobrepeso prepuberal

2.1. Efecto de la sobrenutrición neonatal sobre los parámetros morfológicos y la ingesta

A) Día 21 – Machos y hembras:

Los animales repartidos el día del nacimiento en camadas de 4 ó 12 crías por madre (CM) con igualdad de sexos se organizaron al azar sin diferencias en el peso corporal ni la longitud (peso y longitud de machos 4CM: $6,3 \pm 0,1$ gramos / $5,0 \pm 0,1$ cm; peso y longitud de machos 12CM: $6,2 \pm 0,3$ gramos / $5,0 \pm 0,1$ cm; peso y longitud de hembras 4CM: $6,2 \pm 0,1$ gramos / $4,9 \pm 0,1$ cm; peso y longitud de hembras 12CM: $6,0 \pm 0,3$ gramos / $4,9 \pm 0,1$ cm). El peso corporal se vio afectado por la nutrición neonatal ($p < 0,01$) y el tiempo ($p < 0,01$), con interacción entre ambos factores ($p < 0,01$) (figura 29). Los machos y hembras con sobrenutrición neonatal pesaron más que los controles (ANOVA $p < 0,01$).

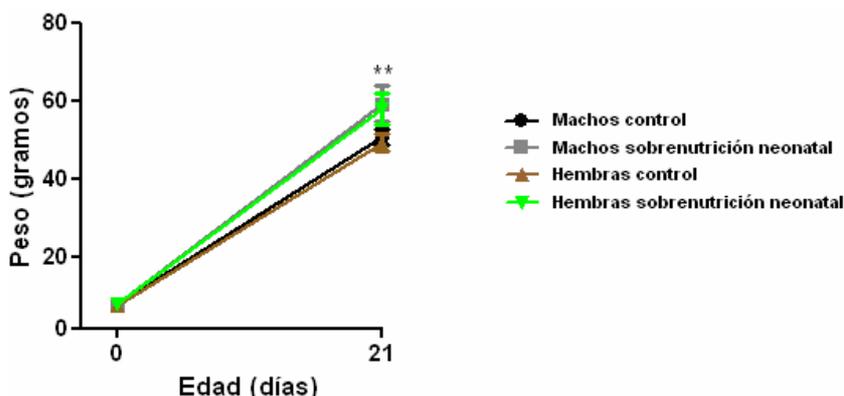


Figura 29. Peso de las ratas en el día postnatal 21 (n=36). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p < 0,01$ entre animales sobrenutridos y control de ambos sexos.

La longitud corporal se vio afectada por la nutrición neonatal ($p < 0,01$) y por el tiempo ($p < 0,01$), con interacción de los dos factores ($p < 0,01$) (figura 30). Los machos y hembras con sobrenutrición neonatal midieron más que los controles (ANOVA $p < 0,01$), sin diferencias entre sexos.

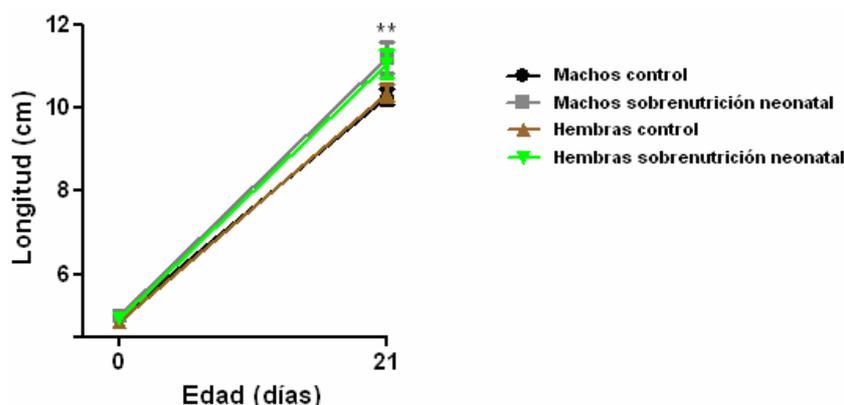


Figura 30. Longitud de las ratas en el día postnatal 21 (n=36). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p < 0,01$ entre animales sobrenutridos y control de ambos sexos.

La grasa subcutánea abdominal relativa se vio afectada por la nutrición neonatal ($p < 0,01$), pero no por el sexo (figura 31). Los machos y hembras con sobrenutrición neonatal presentaron más grasa abdominal relativa que las ratas sometidas a normonutrición (ANOVA $p < 0,01$). La cantidad total de grasa subcutánea abdominal de los dos sexos se muestra en la tabla 9.

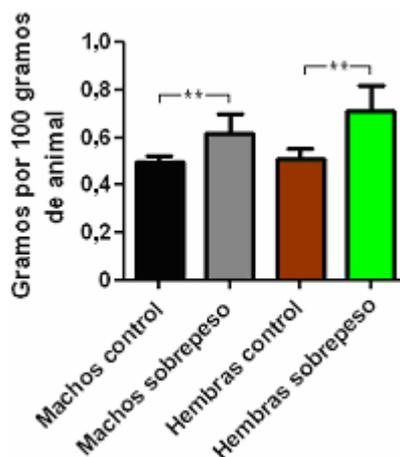


Figura 31. Grasa subcutánea abdominal de las ratas en el día postnatal 21 ($n=36$). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p < 0,01$.

La grasa visceral perigonadal relativa de los machos se vio afectada por la nutrición neonatal ($p < 0,01$), presentando una mayor cantidad relativa de ésta respecto a los controles los animales sometidos a sobrenutrición (figura 32.A). La grasa visceral perigonadal de las hembras también se vio afectada por la nutrición neonatal ($p < 0,01$), presentando las ratas sobrenutridas una mayor cantidad relativa de ésta en relación a los controles (figura 32.B). La cantidad total de grasa perigonadal de los dos sexos se muestra en la tabla 9.

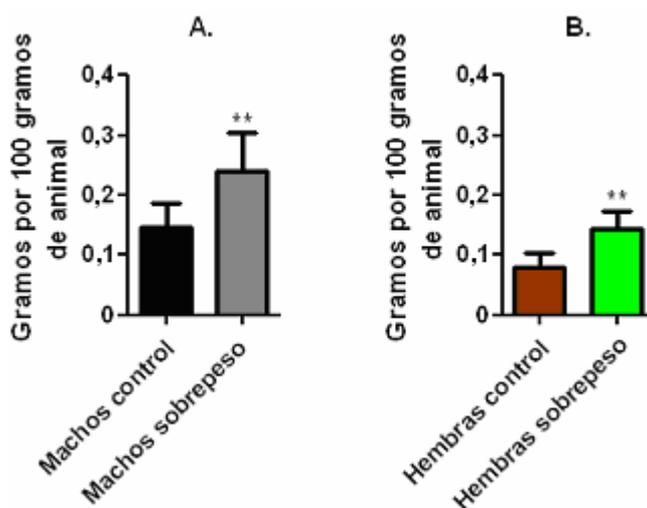


Figura 32. Grasa visceral perigonadal de las ratas macho (A) y hembra (B) en el día postnatal 21 ($n=36$). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p < 0,01$.

La grasa parda relativa se vio afectada por la nutrición neonatal ($p < 0,01$) pero no por el sexo (figura 33). Así pues, los machos y hembras con sobrenutrición neonatal presentaron más grasa parda relativa que las ratas control (ANOVA $p < 0,01$). La cantidad total de grasa parda de los dos sexos se muestra en la tabla 9.

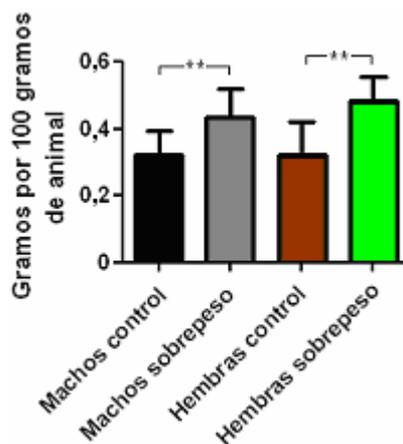


Figura 33. Grasa parda de las ratas en el día postnatal 21 ($n=24$). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p < 0,01$.

El peso relativo de las gónadas de los machos no se vio afectado por la nutrición neonatal (figura 34.A); mientras que en el caso de las hembras sí ($p < 0,01$), presentando una mayor cantidad relativa de éste los animales sometidos a sobrenutrición (figura 34.B). El peso total de las gónadas se muestra en la tabla 9.

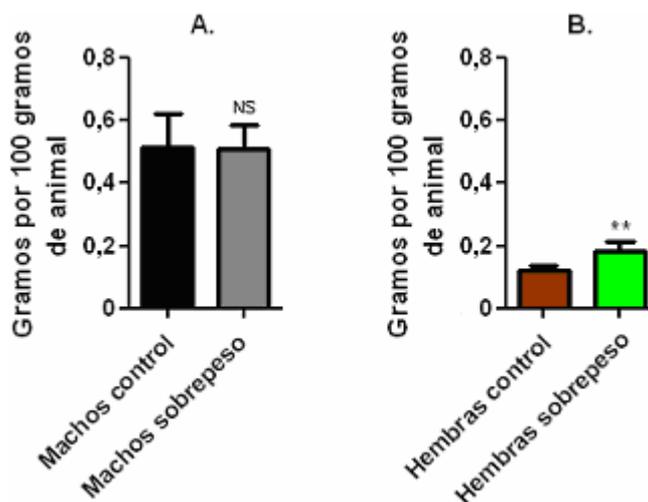


Figura 34. Testículos (A) y ovarios (B) de las ratas en el día postnatal 21 ($n=24$). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p < 0,01$.

Tabla 9. Peso total de las grasas subcutánea abdominal (n=36), visceral perigonadal (n=36) y parda (n=24), y peso total de las gónadas (n=24) de las ratas macho y hembra en el día prepuberal 21. Valores (en gramos) representados como media \pm error estándar.

	Machos control	Machos sobrepeso	Hembras control	Hembras sobrepeso
Grasa subcutánea abdominal	0,2 \pm 0,0	0,4 \pm 0,1 ^a	0,2 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1 ^a
Grasa visceral perigonadal	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0 ^a
Grasa parda	0,2 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1 ^b	0,2 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0 ^a
Gónadas	0,3 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0 ^b

^a $p < 0,01$ comparado con los controles; ^b $p < 0,05$ comparado con los controles.

B) Día 30 – Hembras:

El día del nacimiento los animales se repartieron en camadas de 4 ó 12 crías por madre (CM) con igualdad de sexos y al azar, sin diferencias en el peso corporal ni la longitud (valores no mostrados). Se controló el peso corporal y la longitud de estas ratas los días 22, 25 y 30, además de la ingesta los días 25 y 29. También se monitorizó la apertura vaginal diariamente desde el día 25 al 30, con resultado negativo en todos los casos.

Durante el periodo de tiempo estudiado se produjo un efecto del tiempo ($p < 0,01$) y de la nutrición neonatal ($p < 0,01$) sobre el peso corporal, con una interacción de ambos factores ($p < 0,01$) (figura 35). Las hembras con sobrepeso pesaron más que los controles en los días 25 y 30 (ANOVA $p < 0,01$).

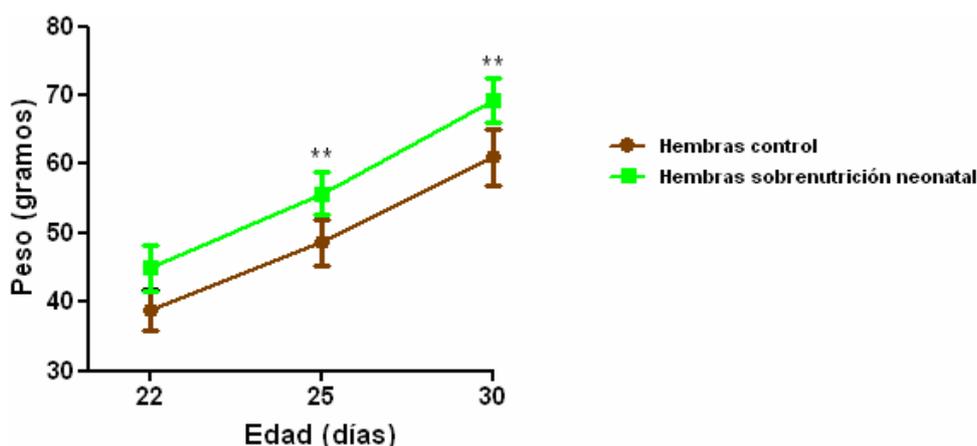


Figura 35. Peso de las ratas hembra en el día peripuberal 30 (n=24). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p < 0,01$ entre hembras sobrenutridas y control.

La longitud corporal también se vio afectada por el tiempo ($p < 0,01$) y la nutrición neonatal ($p < 0,01$), con interacción entre ambos factores ($p < 0,01$) (figura 36). Las hembras con sobrepeso midieron más que los controles en los días 25 y 30 (ANOVA $p < 0,01$).

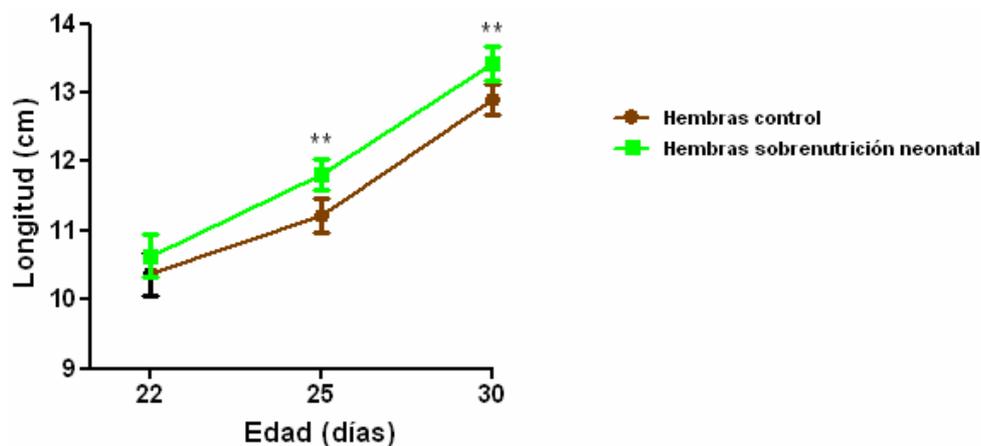


Figura 36. Longitud de las ratas hembra en el día peripuberal 30 (n=24). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p < 0,01$ entre hembras sobrenutridas y control.

La ingesta sólo se vio afectada por la nutrición neonatal ($p < 0,05$) (figura 37), de tal forma que las hembras sobrenutridas comieron más que los controles cuanto más cerca estaban de la pubertad (ANOVA $p < 0,05$).

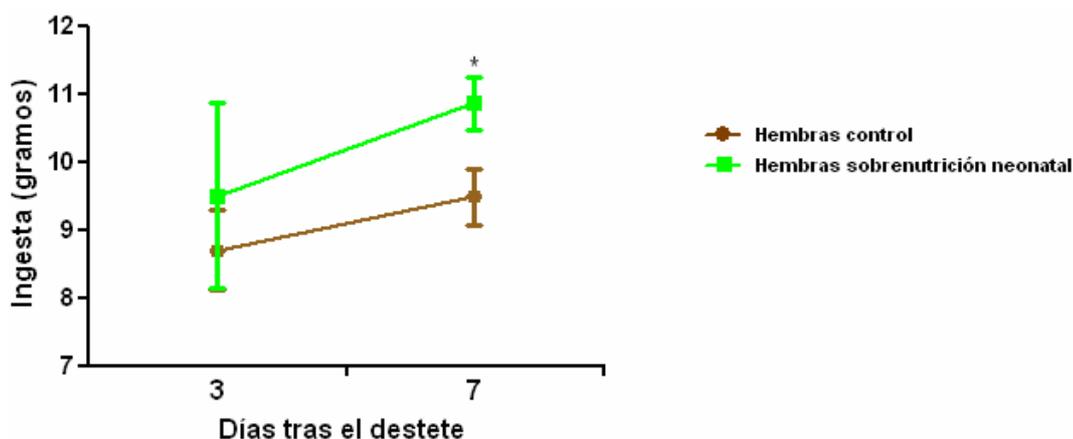


Figura 37. Ingesta de las ratas hembra en el día peripuberal 30 (n=24). Valores representados como media \pm error estándar. * $p < 0,05$ entre hembras sobrenutridas y control.

La cantidad relativa de las grasas subcutánea abdominal, visceral perigonadal y parda, así como el peso relativo de los ovarios no se vieron afectados por la nutrición neonatal (figura 38). El peso total de las grasas y los ovarios se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Peso total de las grasas subcutánea abdominal, visceral perigonadal y parda, y peso total de las gónadas de las ratas hembra en el día peripuberal 30. Valores representados como media \pm error estándar (en gramos).

	Grasa subcutánea abdominal	Grasa visceral perigonadal	Grasa parda	Ovarios
Control	0,3 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
Sobrepeso	0,3 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0

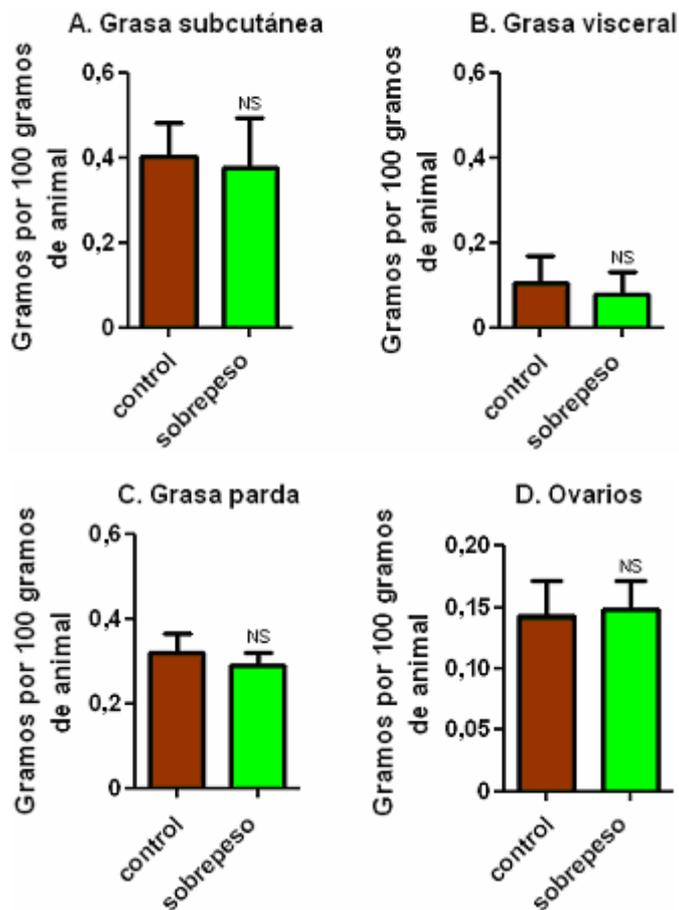


Figura 38. Grasa subcutánea abdominal (A), grasa visceral perigonadal (B), grasa parda (C) y peso de ovarios (D) en las ratas hembra del día peripuberal 30 (n=24). Valores representados como media \pm error estándar. NS: no significativo.

C) Día 35 – Machos:

El día del nacimiento los animales se repartieron en camadas de 4 ó 12 crías por madre (CM) con igualdad de sexos y al azar, sin diferencias en el peso corporal ni la longitud (valores no mostrados). El peso corporal y la longitud de estas ratas se controlaron los días 22, 25, 30 y 35. Además, se controló la ingesta los días 25, 30 y 34, y se monitorizó la retirada balano-prepucial diariamente desde el día 30 al 35, con resultado negativo en todos los casos.

Durante el periodo prepuberal estudiado se produjo un efecto del tiempo ($p < 0,01$) y de la nutrición neonatal ($p < 0,01$) sobre el peso corporal, con una interacción de ambos factores ($p < 0,01$) (figura 39). Los machos con sobrepeso pesaron más que los controles en este periodo de tiempo.

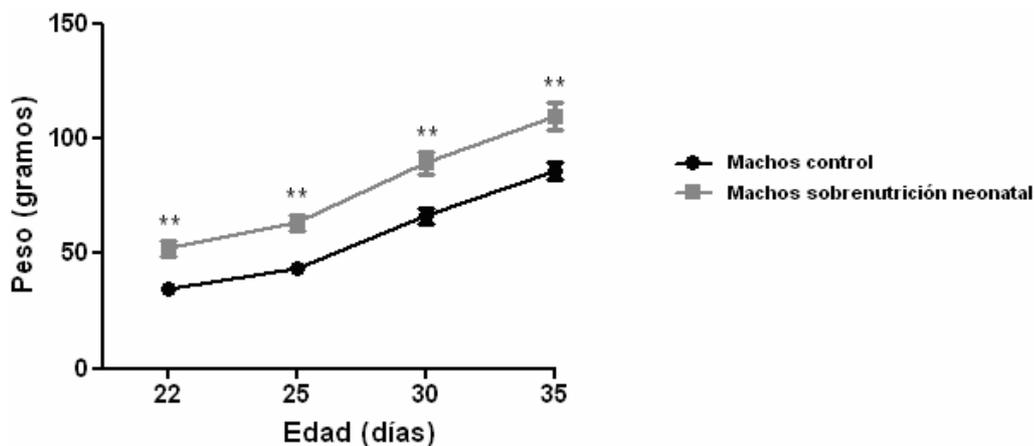


Figura 39. Peso de las ratas macho en el día peripuberal 35 (n=24). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p < 0,01$ entre machos sobrenutridos y control.

La longitud corporal también se vio afectada por el tiempo ($p < 0,01$) y la nutrición neonatal ($p < 0,01$), con interacción entre ambos factores ($p < 0,01$) (figura 40). Los machos con sobrepeso midieron más que los controles durante este periodo temporal.

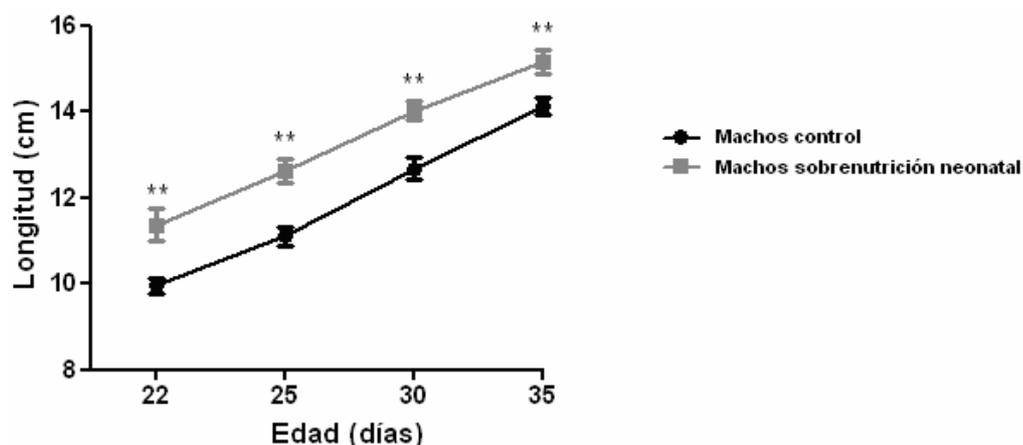


Figura 40. Longitud de las ratas macho en el día peripuberal 35 (n=24). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p < 0,01$ entre machos sobrenutridos y control.

La ingesta se vio afectada por el tiempo ($p < 0,01$) y la nutrición neonatal ($p < 0,05$), con interacción de los dos factores ($p < 0,05$) (figura 41). Los animales control y con sobrepeso aumentaron su ingesta gradualmente, comiendo estos últimos más hasta 8 días después del destete, sin diferencias significativas entre los dos grupos en la ingesta peripuberal (ANOVA, $p < 0,01$).

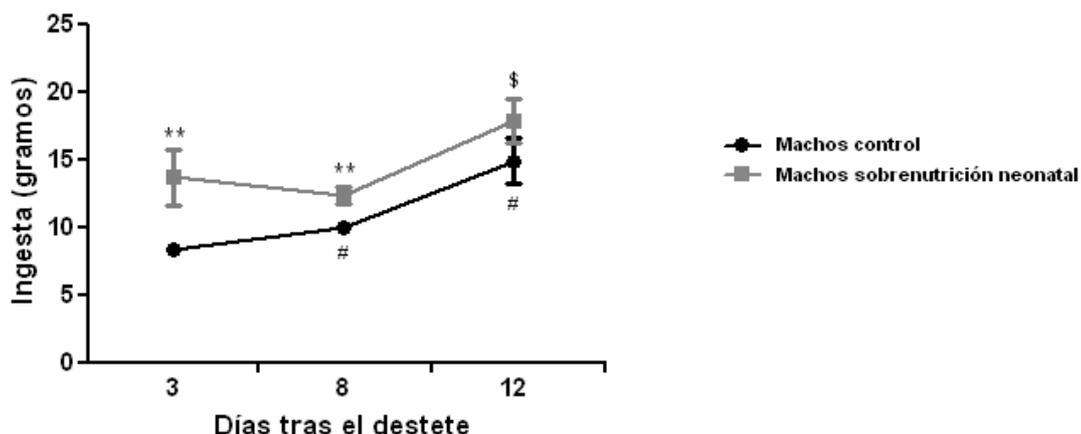


Figura 41. Ingesta de las ratas macho en el día peripuberal 35 (n=24). Valores representados como media \pm error estándar. ** p<0,01 entre machos sobrenutridos y control; #: p<0,01 respecto al periodo anterior en machos control; \$: p<0,01 respecto al periodo anterior en machos con sobrepeso.

La cantidad relativa de grasa visceral perigonadal se vio afectada por la nutrición neonatal (p<0,01), siendo superior en los machos con sobrepeso respecto a los controles (figura 42). La cantidad total de grasa visceral se muestra en la tabla 11.

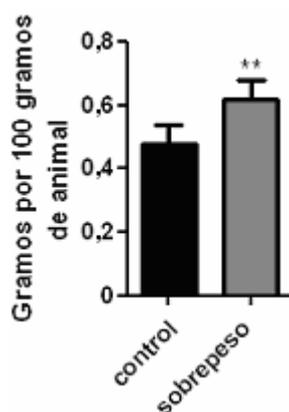


Figura 42. Grasa visceral perigonadal de las ratas macho en el día peripuberal 35 (n=24). Valores representados como media \pm error estándar. ** p<0,01.

La cantidad relativa de las grasas subcutánea abdominal y parda no se vio afectada por la nutrición neonatal (figura 43). La cantidad total de estas grasas se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Grasas subcutánea abdominal, visceral perigonadal y parda (en gramos) de las ratas macho en el día peripuberal 35. Valores representados como media \pm error estándar.

	Grasa subcutánea abdominal	Grasa visceral perigonadal	Grasa parda
Control	0,3 \pm 0,0	0,4 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0
Sobrepeso	0,3 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1 ^a	0,2 \pm 0,0

^a p<0,01 comparado con los controles.

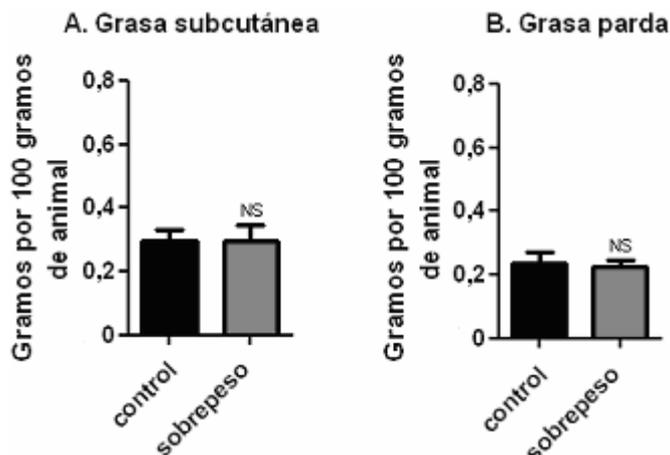


Figura 43. Grasa subcutánea abdominal (A) y grasa parda (B) en las ratas macho del día peripuberal 35 (n=24). Valores representados como media \pm error estándar. NS: no significativo.

El peso relativo de los testículos estuvo afectado por la nutrición neonatal ($p < 0,01$) (figura 44), siendo superior en los machos con sobrepeso respecto de los controles. El peso total de los testículos fue $0,9 \pm 0,1$ y $1,2 \pm 0,1$ gramos en los machos control y con sobrepeso, respectivamente, siendo en estos últimos significativamente superior ($p < 0,01$).

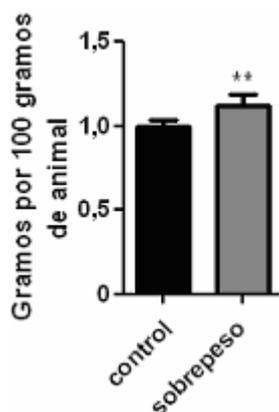


Figura 44. Peso de los testículos de las ratas macho en el día peripuberal 35 (n=24). Valores representados como media \pm error estándar. ** $p < 0,01$.

2.2. Efecto del tratamiento agudo con leptina sobre los niveles hormonales circulantes y la señalización intracelular de la misma en el hipotálamo

A) Día 21 – Machos y hembras – Leptina 45 minutos:

Los niveles circulantes de leptina se vieron afectados por el sexo ($p < 0,05$) y el tratamiento ($p < 0,01$), con interacción de ambos factores ($p < 0,05$) (figura 45). En los animales control y con sobrepeso de ambos sexos no hubo diferencias significativas después del tratamiento con vehículo. Ambos grupos y sexos respondieron al tratamiento con leptina, incrementando la concentración circulante de la misma, sin diferencias significativas entre

ellos, a excepción de las hembras control, donde la concentración de la hormona fue menor que en los machos control (ANOVA $p < 0,01$).

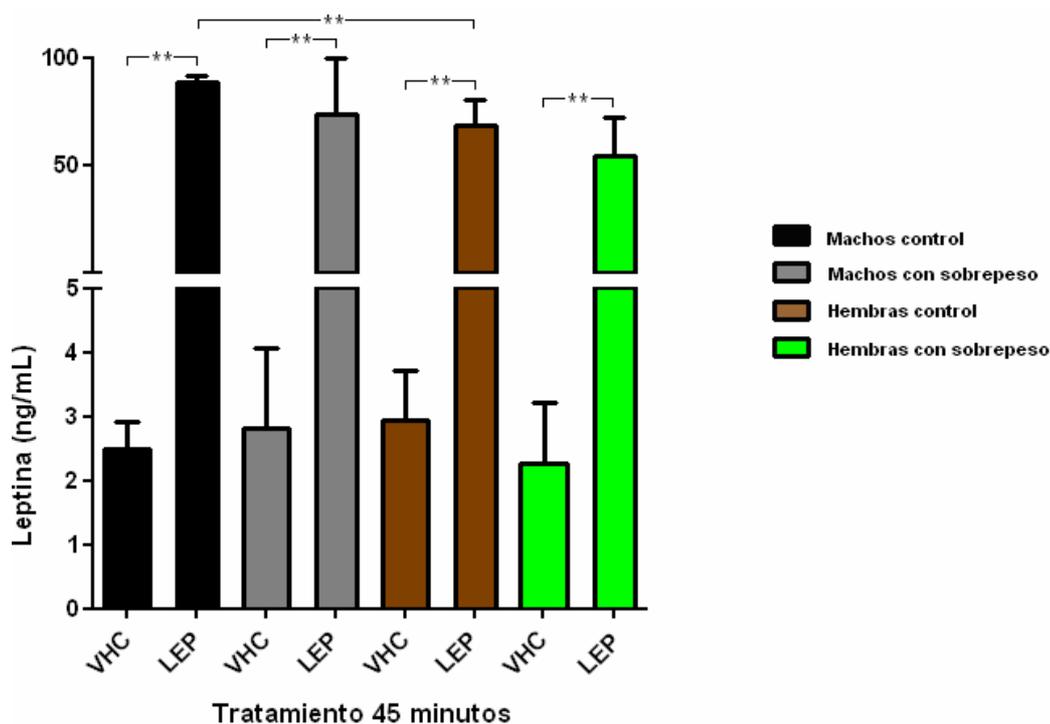


Figura 45. Leptina circulante en las ratas macho y hembra de día postnatal 21 tras 45 minutos de la inyección de leptina intraperitoneal ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. VHC: vehículo; LEP: leptina; ** $p < 0,01$.

La glucemia antes del tratamiento no se vio afectada por la nutrición neonatal ni por el sexo. Después de los respectivos tratamientos tampoco hubo efecto de la nutrición neonatal, del sexo ni del propio tratamiento (tabla 12).

Tabla 12. Glucemia (mg/dL) antes y después de los tratamientos en las ratas de día postnatal 21 ($n=18$). Valores representados como media \pm error estándar. C: control; S: sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina.

	♂ C VHC	♂ C LEP	♂ S VHC	♂ S LEP	♀ C VHC	♀ C LEP	♀ S VHC	♀ S LEP
Antes	137,3 \pm 11,8	128,1 \pm 14,6	128,3 \pm 13,0	129,2 \pm 9,6	129,5 \pm 14,9	131,0 \pm 11,2	126,2 \pm 16,1	123,4 \pm 11,8
Después	141,5 \pm 13,5	134,9 \pm 14,1	131,8 \pm 18,3	137,9 \pm 11,4	138,3 \pm 12,2	139,8 \pm 12,0	136,7 \pm 13,5	126,5 \pm 14,4

La insulina circulante no se vio afectada por la nutrición neonatal, el sexo ni el tratamiento (figura 46). Nótese que en todos los grupos de hembras existió mayor variabilidad que en los machos.

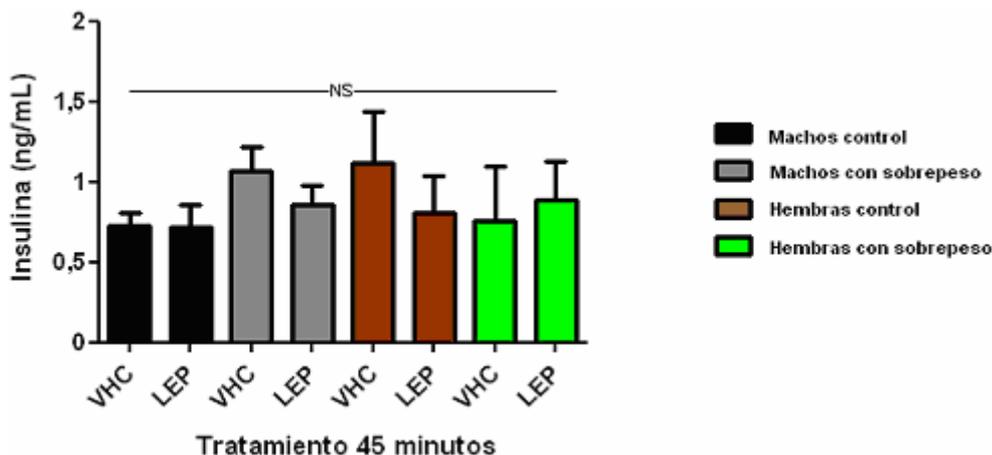


Figura 46. Insulina circulante en las ratas macho y hembra de día postnatal 21 tras 45 minutos de la inyección de leptina intraperitoneal (n=6). Valores representados como media \pm error estándar. VHC: vehículo; LEP: leptina; NS: no significativo.

El índice de resistencia a la insulina mediante evaluación del modelo homeostático ($[\text{Glucosa (mmol/L)} \times \text{insulina (mU/mL)}] / 22,5$) se vio afectado por la interacción entre el sexo y la nutrición neonatal ($p < 0,05$) (figura 47). Este índice fue mayor solamente en los machos con sobrepeso tratados con vehículo o leptina respecto a sus controles (ANOVA $p < 0,05$). En todos los grupos de hembras existió mucha variabilidad en este índice.

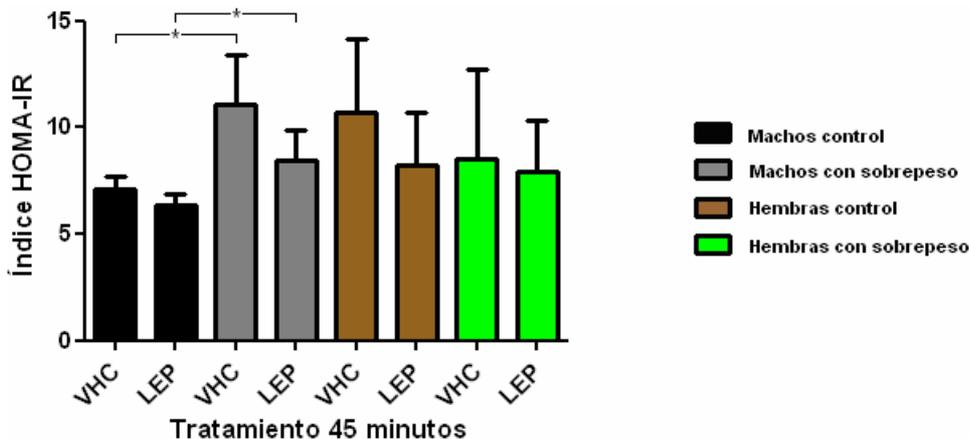


Figura 47. Índice de resistencia a la insulina mediante evaluación del modelo homeostático (HOMA-IR) en las ratas macho y hembra de día postnatal 21 tras 45 minutos de la inyección de leptina intraperitoneal (n=6). Valores representados como media \pm error estándar. VHC: vehículo; LEP: leptina; * $p < 0,05$.

La concentración de la hormona luteinizante en este punto temporal no estuvo afectada por la nutrición neonatal, el sexo ni el tratamiento (figura 48).

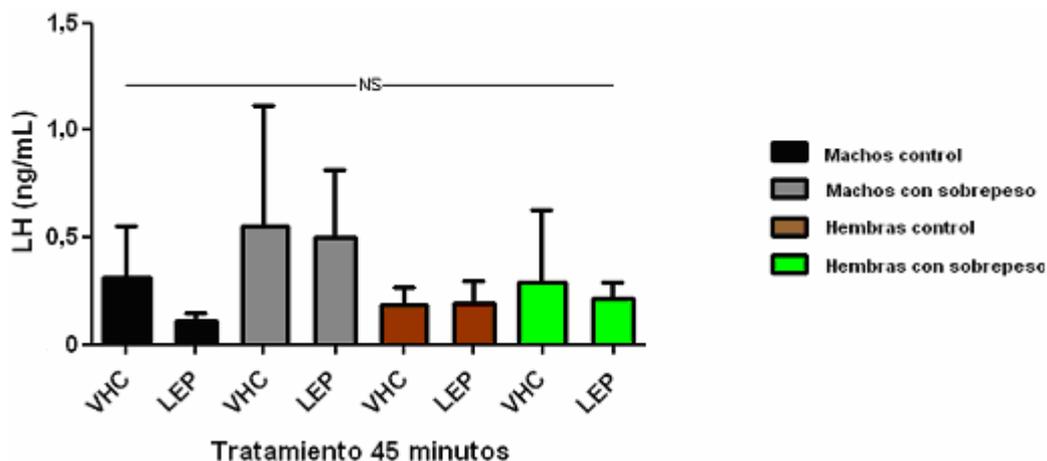


Figura 48. Hormona luteinizante (LH) circulante en las ratas macho y hembra de día postnatal 21 tras 45 minutos de la inyección de leptina intraperitoneal (n=6). Valores representados como media \pm error estándar. VHC: vehículo; LEP: leptina; NS: no significativo.

La concentración de testosterona en los machos se vio afectada por la nutrición neonatal ($p < 0,05$) y el tratamiento ($p < 0,05$), con interacción entre ambos factores ($p < 0,05$) (figura 49). Los machos con sobrepeso tratados con vehículo tenían más testosterona circulante que los controles (ANOVA $p < 0,05$). Los dos grupos respondieron de manera inversa al tratamiento con leptina, viéndose incrementada la concentración de testosterona en los machos con normopeso respecto de los tratados con vehículo (ANOVA $p < 0,05$) y disminuida en los individuos con sobrepeso respecto de los tratados con vehículo (ANOVA $p < 0,05$).

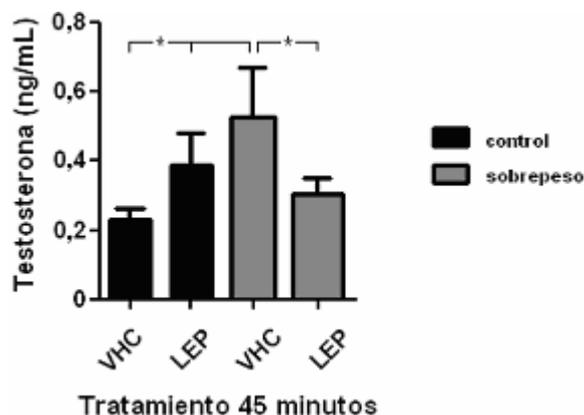


Figura 49. Testosterona circulante en las ratas macho de día postnatal 21 tras 45 minutos de la inyección de leptina intraperitoneal (n=6). Valores representados como media \pm error estándar. VHC: vehículo; LEP: leptina; * $p < 0,05$.

A.1) Día 21 – Machos:

• Proteínas de señalización:

Los niveles de STAT3 fosforilado en el residuo de tirosina 705 se vieron modificados por la nutrición neonatal ($p < 0,01$) y por el tratamiento ($p < 0,01$), sin interacción entre los dos factores (figura 50.A). Los machos con sobrepeso tratados con vehículo tenían menos

cantidad de p-STAT3 (Tyr705) que los controles (ANOVA $p < 0,01$). Ambos grupos respondieron al tratamiento con leptina incrementando la cantidad de proteína fosforilada respecto a los machos tratados con vehículo (ANOVA $p < 0,01$), siendo ésta menor en los machos con sobrepeso respecto a los controles (ANOVA $p < 0,01$).

La cantidad relativa de STAT3 fosforilado en el residuo de serina 727 solamente se vio afectada por la nutrición neonatal ($p < 0,05$) (figura 50.B). No hubo diferencias significativas entre los controles y las ratas con sobrepeso tratadas con vehículo. Sin embargo, la cantidad de esta proteína en los machos con sobrepeso tratados con leptina fue superior a la de los controles (ANOVA $p < 0,05$).

Los niveles de Akt fosforilado se vieron afectados por la nutrición neonatal ($p < 0,05$) y el tratamiento ($p < 0,05$), sin interacción entre los dos factores (figura 50.C). No hubo diferencias entre los controles y las ratas con sobrepeso tratadas con vehículo. Los dos grupos respondieron al tratamiento con leptina, pero de manera inversa: en los controles disminuyó la cantidad de p-Akt respecto a los machos tratados con vehículo (ANOVA $p < 0,05$), mientras que en los machos con sobrepeso aumentó respecto a los tratados con vehículo (ANOVA $p < 0,05$).

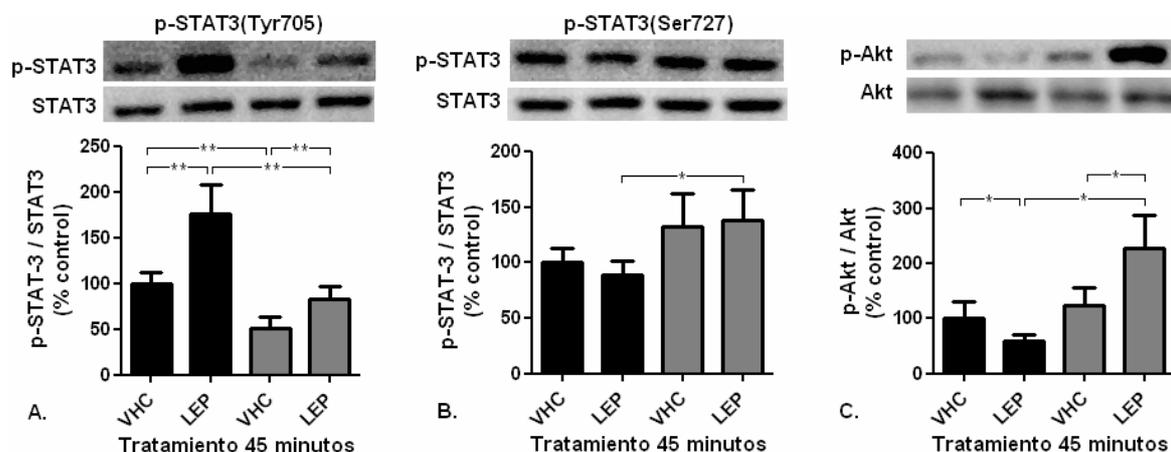


Figura 50. Niveles relativos de las proteínas de señalización por leptina en el hipotálamo modificados tras 45 minutos de la inyección de leptina intraperitoneal en ratas macho de día postnatal 21 (n=6). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; Akt: proteína quinasa específica de serina/treonina; p-: forma fosforilada; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

En las proteínas de señalización JAK2 y ERKs no hubo efecto de la nutrición neonatal ni del tratamiento (figura 51).

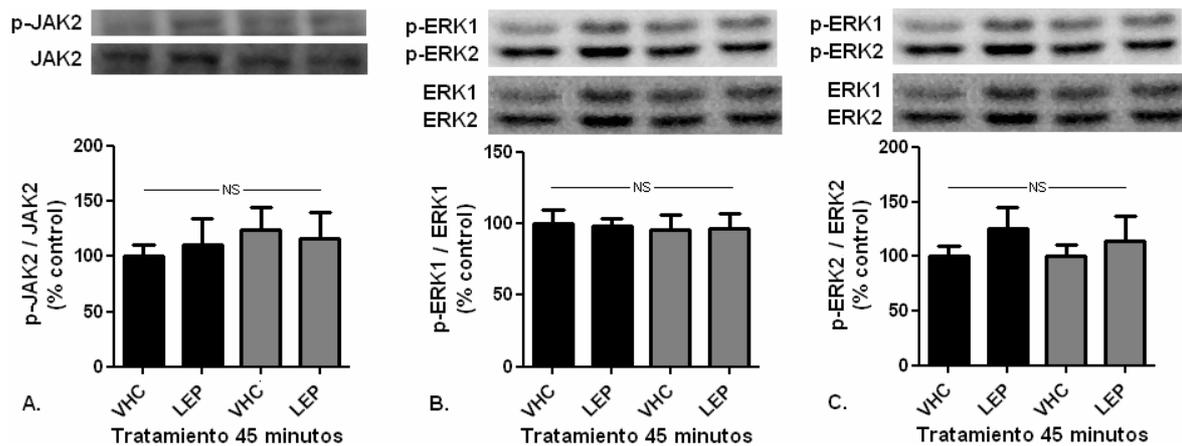


Figura 51. Niveles relativos de las proteínas de señalización por leptina en el hipotálamo no modificados tras 45 minutos de la inyección de leptina intraperitoneal en ratas macho de día postnatal 21 ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; JAK2: Janus quinasa 2; ERK: quinasa relacionada con señal extracelular; p-: forma fosforilada; NS: no significativo.

● Reguladores negativos de la señalización:

Los niveles de PTEN fosforilado estuvieron afectados por la nutrición neonatal ($p<0,05$) y el tratamiento ($p<0,05$), con una interacción entre los dos factores ($p<0,05$) (figura 52.A). Los machos con sobrepeso tratados con vehículo tenían una mayor cantidad de p-PTEN que los controles (ANOVA $p<0,05$). Sólo los machos con sobrepeso respondieron al tratamiento con leptina, disminuyendo la cantidad de p-PTEN (ANOVA $p<0,05$).

La cantidad relativa de PTP1B se vio afectada por la nutrición neonatal ($p<0,05$) (figura 52.B). No hubo diferencias significativas entre los controles y las ratas con sobrepeso tratadas con vehículo o leptina, respectivamente. No obstante, la cantidad de proteína en los machos con sobrepeso tratados con leptina fue mayor que en los controles con el mismo tratamiento (ANOVA $p<0,05$).

No hubo efecto de la nutrición neonatal ni del tratamiento sobre los niveles de SOCS3 (figura 52.C).

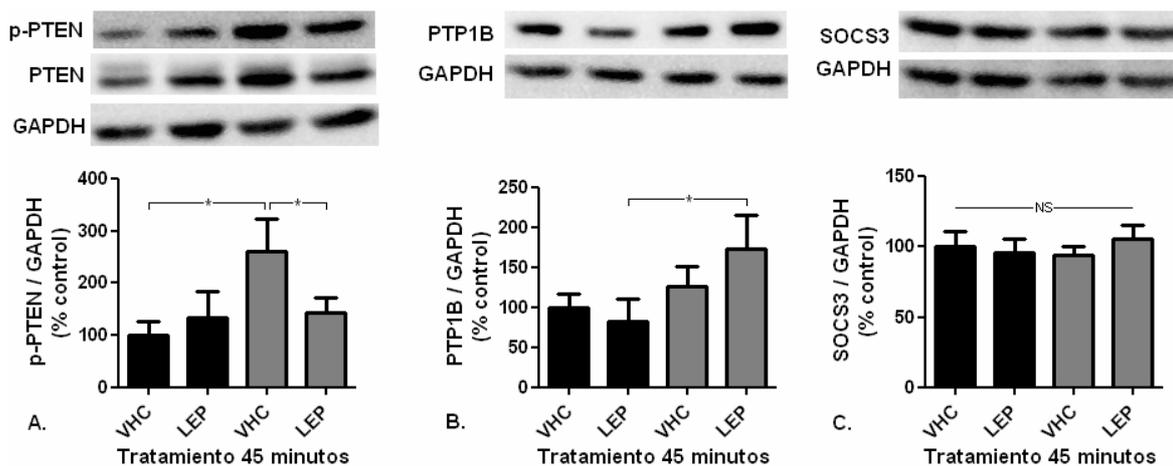


Figura 52. Niveles relativos de los reguladores negativos de la señalización por leptina en hipotálamo tras 45 minutos de la inyección de leptina intraperitoneal en ratas macho de día postnatal 21 ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; PTEN: homólogo de la fosfatasa y la tensina; PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B; SOCS3: supresor de la señalización por citoquinas 3; GAPDH: gliceraldehído 3-fostato deshidrogenasa; p-: forma fosforilada; * $p<0,05$; NS – no significativo.

A.2) Día 21 – Hembras:

● Proteínas de señalización:

Los niveles de STAT3 fosforilado en el residuo de tirosina 705 se vieron modificados por la nutrición neonatal ($p<0,05$) y por el tratamiento ($p<0,05$), sin interacción entre los dos factores (figura 53.A). Las hembras con sobrepeso tratadas con vehículo tenían menos cantidad de p-STAT3 (Tyr705) que los controles con el mismo tratamiento (ANOVA $p<0,05$). Ambos grupos respondieron al tratamiento con leptina incrementando la cantidad de proteína fosforilada respecto a las hembras tratadas con vehículo (ANOVA $p<0,05$), siendo ésta menor en las hembras con sobrepeso respecto a los controles (ANOVA $p<0,05$).

Los niveles de Akt fosforilado se vieron afectados por la interacción entre la nutrición neonatal y el tratamiento ($p<0,01$) (figura 53.B). Las hembras con sobrepeso tratadas con vehículo tenían menos cantidad de Akt fosforilado que los controles (ANOVA $p<0,05$). Después del tratamiento con leptina, sólo las hembras con sobrepeso respondieron a la hormona, incrementando la cantidad de Akt fosforilado respecto a los controles (ANOVA $p<0,05$).

En las proteínas de señalización STAT3 (serina 727), JAK2 y ERKs no hubo efecto de la nutrición neonatal ni del tratamiento (figura 53.C-F).

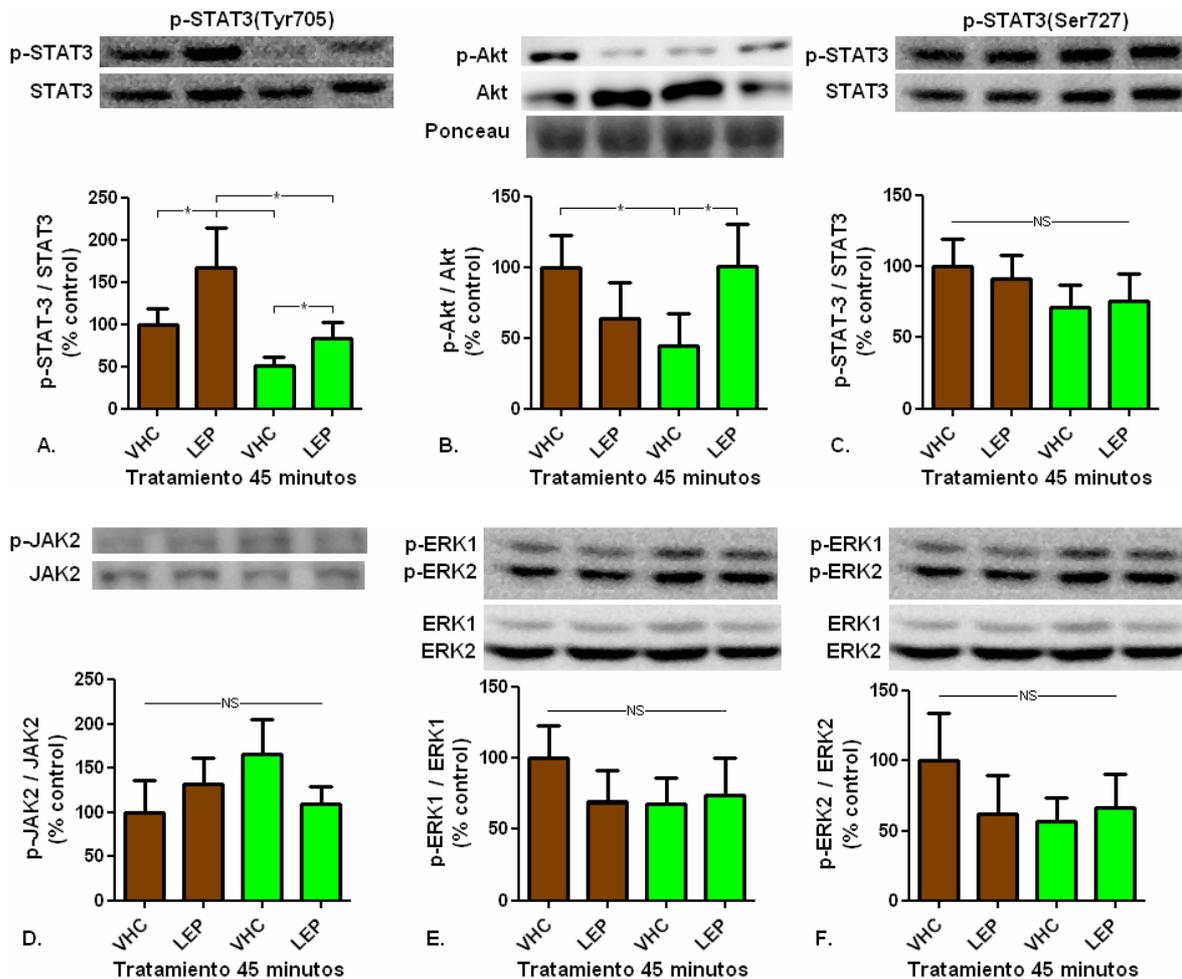


Figura 53. Niveles relativos de las proteínas de señalización por leptina en el hipotálamo tras 45 minutos de la inyección de leptina intraperitoneal en ratas hembra de día postnatal 21 ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; Akt: proteína quinasa específica de serina/treonina; JAK2: Janus quinasa 2; ERK: quinasa relacionada con señal extracelular; p-: forma fosforilada; * $p<0,05$; NS: no significativo.

● Reguladores negativos de la señalización:

La cantidad relativa de PTP1B se vio afectada por la nutrición neonatal ($p<0,01$) (figura 54.A), siendo los niveles de esta proteína superiores en las hembras con sobrepeso tratadas con vehículo y leptina en relación con sus respectivos controles (ANOVA $p<0,05$).

No hubo efecto de la nutrición neonatal ni del tratamiento sobre los niveles de los otros dos reguladores negativos estudiados: SOCS3 y p-PTEN (figura 54.B-C).

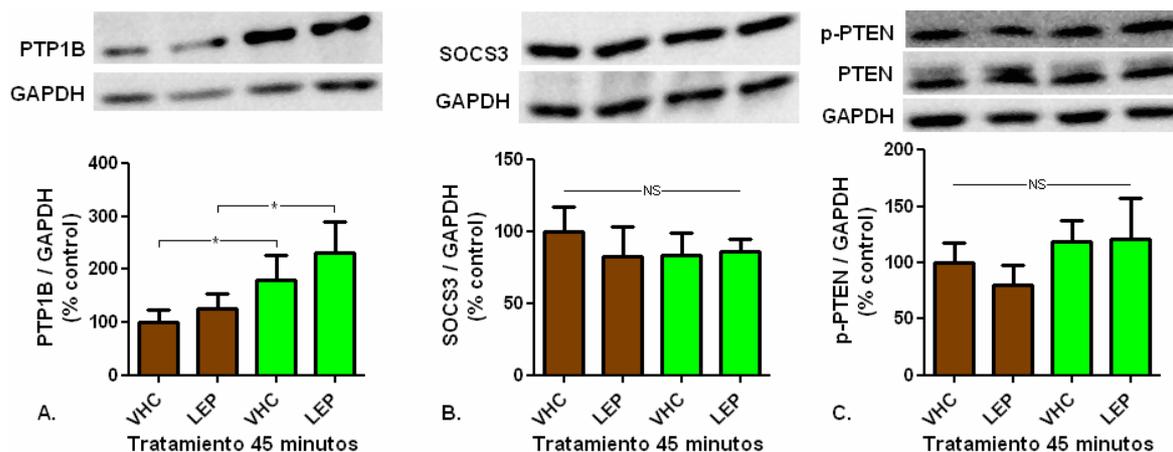


Figura 54. Niveles relativos de los reguladores negativos de la señalización por leptina en hipotálamo tras 45 minutos de la inyección de leptina intraperitoneal en ratas hembra de día postnatal 21 ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B; SOCS3: supresor de la señalización por citoquinas 3; PTEN: homólogo de la fosfatasa y la tensina; GAPDH: gliceraldehído 3-fostato deshidrogenasa; p-: forma fosforilada; * $p<0,05$; NS: no significativo.

B) Día 30 – Hembras – Leptina 45 minutos y 2 horas:

Los niveles circulantes de leptina se vieron afectados por la nutrición neonatal ($p<0,01$), el tratamiento ($p<0,01$) y el tiempo ($p<0,01$), con interacción de la nutrición neonatal y el tratamiento ($p<0,05$), y el tratamiento y el tiempo ($p<0,05$) (figura 55). A los 45 minutos de la administración de vehículo la concentración hormonal era mayor en las hembras con sobrepeso respecto de los controles (ANOVA $p<0,01$), manteniéndose sin cambios significativos en ambos grupos a las 2 horas. Los dos grupos de animales respondieron al tratamiento con leptina, viéndose incrementada la concentración circulante de la hormona a los 45 minutos en relación con sus respectivos controles tratados con vehículo (ANOVA $p<0,01$), sin diferencias significativas entre ellos. A las 2 horas la concentración de leptina disminuyó en ambos grupos respecto al tiempo de 45 minutos (ANOVA $p<0,01$), presentando en este momento las hembras con sobrepeso una concentración de leptina superior a la de sus controles (ANOVA $p<0,01$).

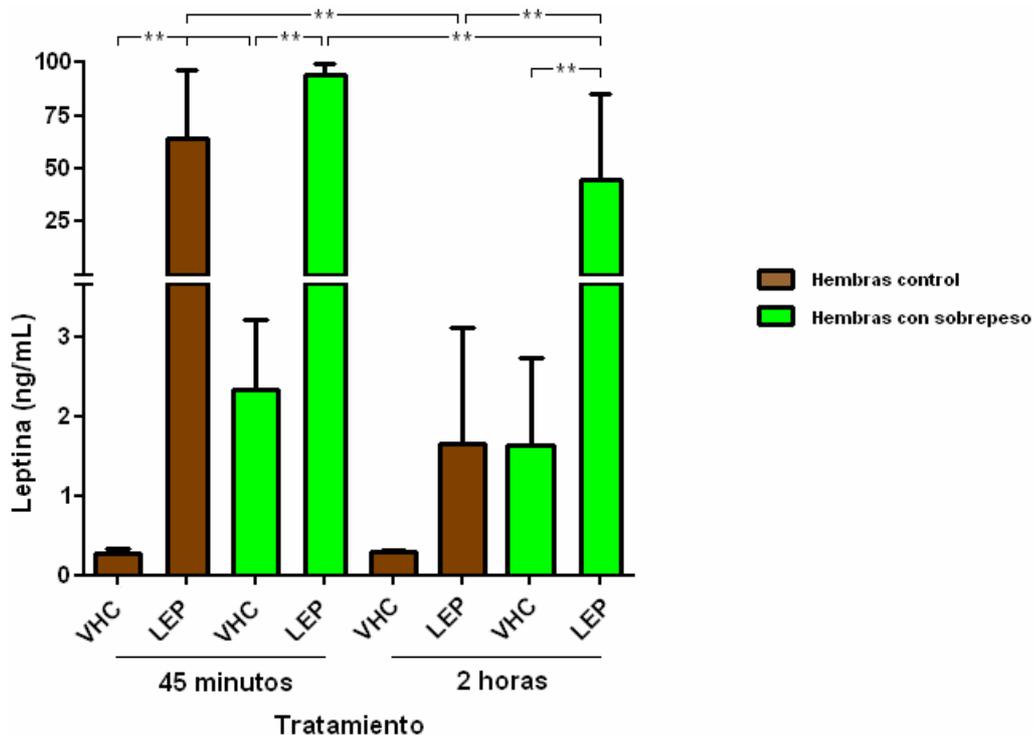


Figura 55. Leptina circulante en las ratas hembra de día peripuberal 30 tras 45 minutos y 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal (n=6). Valores representados como media \pm error estándar. VHC: vehículo; LEP: leptina; ** p<0,01.

Los niveles circulantes de insulina no se vieron modificados por la nutrición neonatal, el tratamiento ni el tiempo (figura 56).

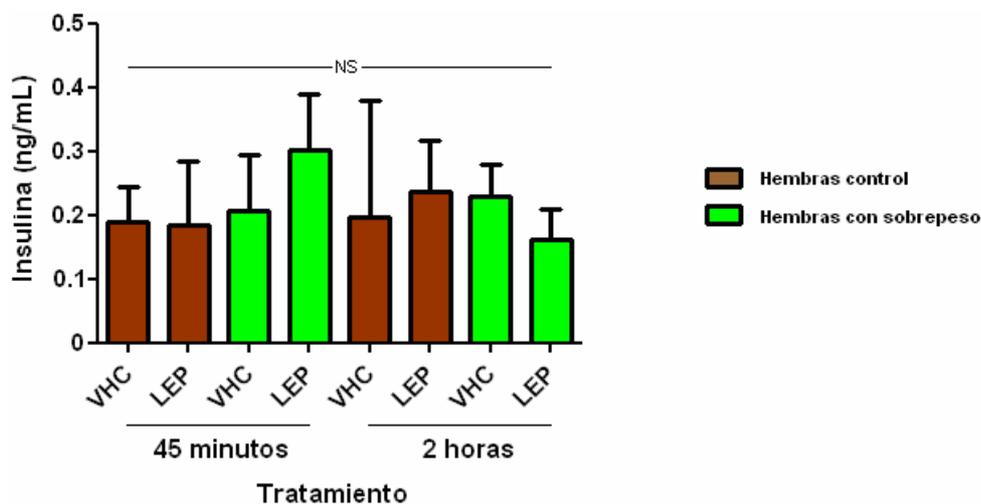


Figura 56. Insulina circulante en las ratas hembra de día peripuberal 30 tras 45 minutos y 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal (n=6). Valores representados como media \pm error estándar. VHC: vehículo; LEP: leptina; NS: no significativo.

Los niveles circulantes de la hormona luteinizante no se vieron modificados por la nutrición neonatal, el tratamiento ni el tiempo (figura 57).

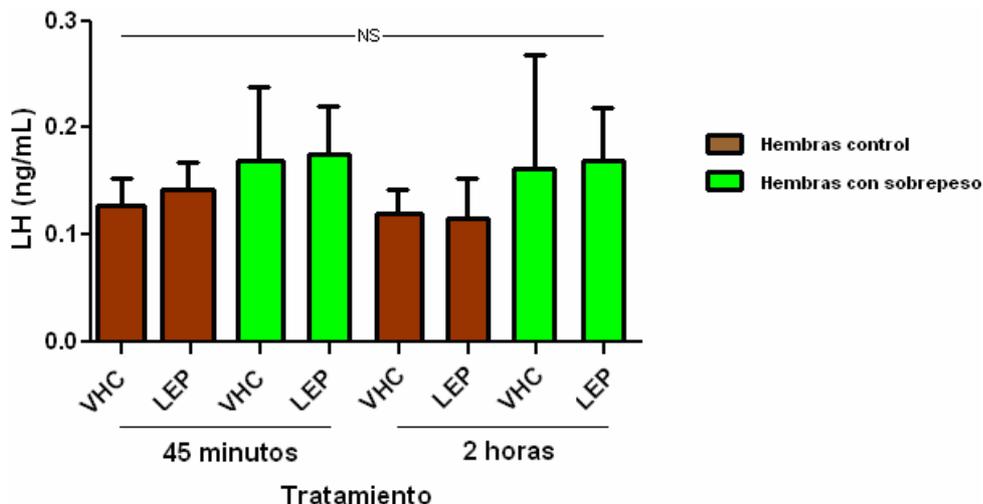


Figura 57. Hormona luteinizante (LH) circulante en las ratas hembra de día peripuberal 30 tras 45 minutos y 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. VHC: vehículo; LEP: leptina; NS: no significativo.

Los niveles circulantes de estradiol no se vieron modificados por la nutrición neonatal, el tratamiento ni el tiempo (figura 58).

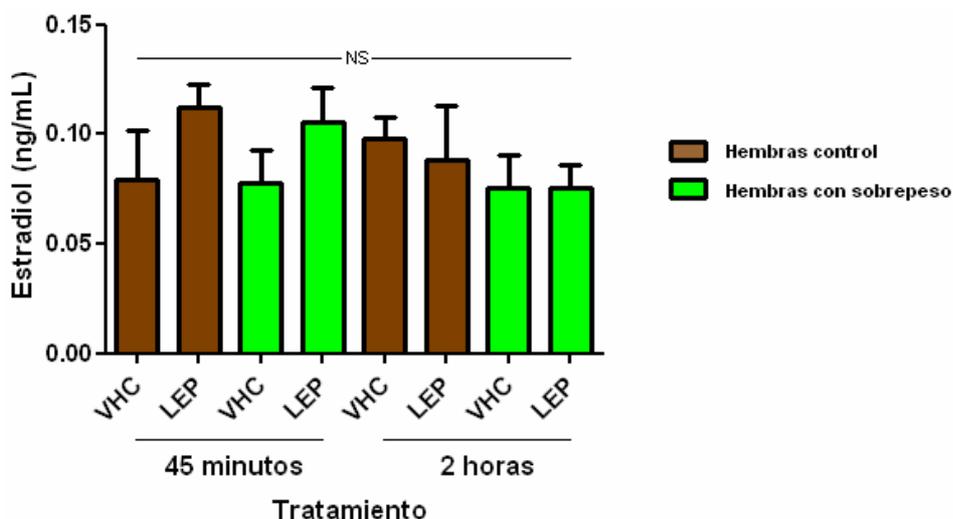


Figura 58. Estradiol circulante en las ratas hembra de día peripuberal 30 tras 45 minutos y 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. VHC: vehículo; LEP: leptina; NS: no significativo.

B.1) Día 30 – Hembras – Leptina 45 minutos:

• Proteínas de señalización:

En las hembras control y con sobrepeso tratadas con vehículo no se detectó STAT3 fosforilado en tirosina 705. Ambos grupos respondieron a la administración de leptina incrementando la fosforilación de esta proteína, sin diferencias significativas entre ellos (figura 59.A).

La cantidad relativa de STAT3 fosforilado en el residuo de serina 727 se vio afectada por la nutrición neonatal ($p < 0,01$) (figura 59.B), presentando las hembras con sobrepeso de ambos tratamientos una cantidad superior de proteína fosforilada en serina 727 respecto a sus controles (ANOVA $p < 0,05$).

Los niveles de la proteína ERK-2 fosforilada se vieron afectados por la interacción entre la nutrición neonatal y el tratamiento ($p < 0,05$) (figura 59.C). No hubo diferencias significativas entre las hembras control y con sobrepeso tratadas con vehículo. Solamente las hembras con sobrepeso respondieron al tratamiento con leptina incrementando la cantidad de p-ERK-2 respecto a las hembras con sobrepeso tratadas con vehículo (ANOVA $p < 0,05$).

No hubo efecto de la nutrición neonatal ni del tratamiento sobre los niveles de las proteínas de señalización JAK-2, Akt y ERK-1 (figura 59.D-F).

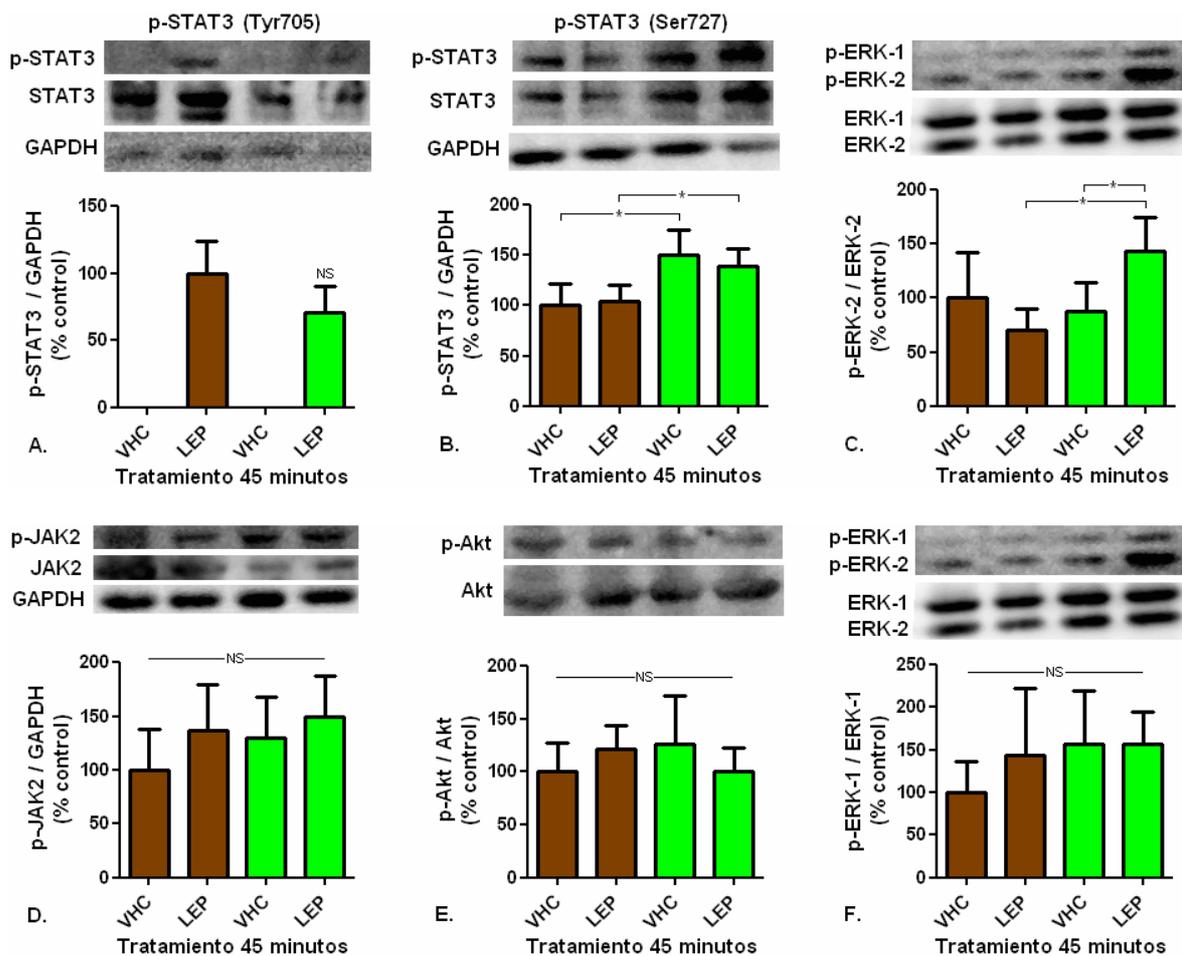


Figura 59. Niveles relativos de las proteínas de señalización por leptina en el hipotálamo tras 45 minutos de la inyección de leptina intraperitoneal en ratas hembra de día peripuberal 30 ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; ERK: quinasa relacionada con señal extracelular; JAK2: Janus quinasa 2; Akt: proteína quinasa específica de serina/treonina; p-: forma fosforilada; * $p < 0,05$; NS: no significativo.

- **Reguladores negativos de la señalización:**

La cantidad relativa de PTEN fosforilado estuvo influenciada por la nutrición neonatal ($p < 0,01$) (figura 60.A), siendo los niveles de esta proteína inferiores en las hembras con sobrepeso tratadas con vehículo y leptina, respecto de sus controles ($p < 0,01$).

Los niveles de las dos isoformas del regulador negativo PTP1B (membrana y citoplasma) se vieron afectados por la nutrición neonatal ($p < 0,05$) y por el tratamiento ($p < 0,05$), sin interacción entre los dos factores (figuras 60.B-C y 61.A). En ambos casos, la cantidad relativa de las dos isoformas fue inferior en las hembras con sobrepeso tratadas con vehículo respecto a las hembras control con el mismo tratamiento (ANOVA $p < 0,05$). Únicamente las hembras con normopeso respondieron al tratamiento con leptina, viéndose disminuidos los niveles de las dos isoformas respecto a las hembras con normopeso tratadas con vehículo (ANOVA $p < 0,05$). El porcentaje de la isoforma de membrana fue superior en todos los grupos.

No hubo efecto de la nutrición neonatal ni del tratamiento sobre la cantidad relativa de SOCS3 (figura 61.B).

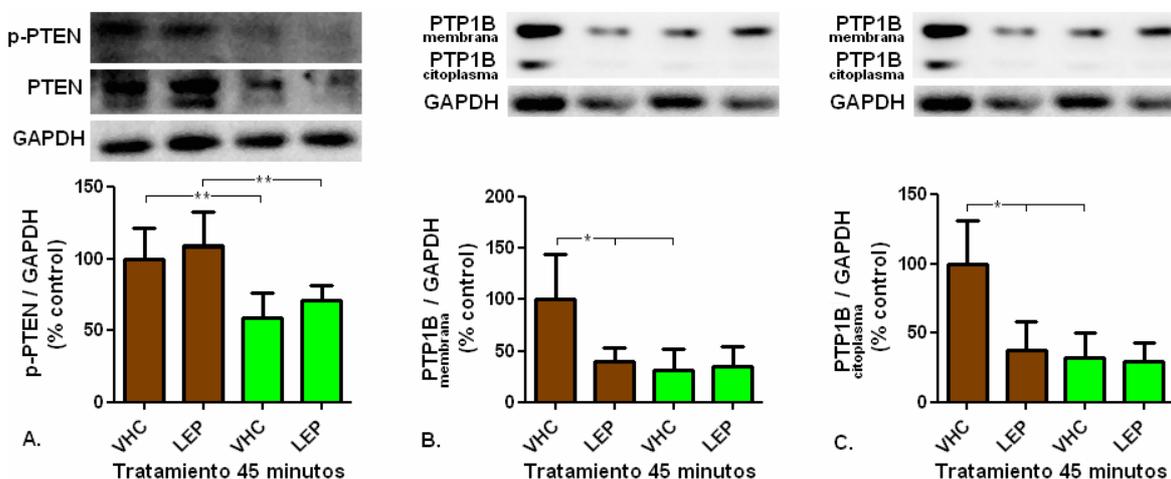


Figura 60. Niveles relativos de los reguladores negativos de la señalización por leptina en hipotálamo tras 45 minutos de la inyección de leptina intraperitoneal en ratas hembra de día peripuberal 30 ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; PTEN: homólogo de la fosfatasa y la tensina; PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B; GAPDH: gliceraldehído 3-fostato deshidrogenasa; p-: forma fosforilada; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

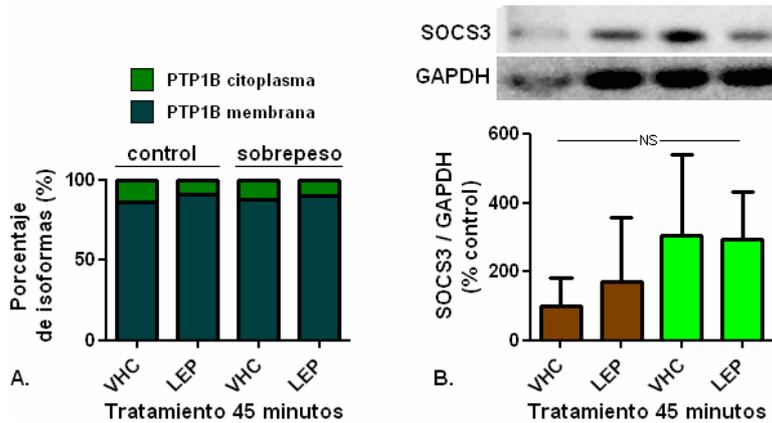


Figura 61. Niveles relativos de los reguladores negativos de la señalización por leptina en hipotálamo tras 45 minutos de la inyección de leptina intraperitoneal en ratas hembra de día peripuberal 30 (n=6). Valores representados como media \pm error estándar (excepto gráfica A). ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B; SOCS3: supresor de la señalización por citoquinas 3; GAPDH: gliceraldehído 3-fostato deshidrogenasa; NS: no significativo.

B.2) Día 30 – Hembras – Leptina 2 horas:

● Proteínas de señalización:

Los niveles de STAT3 fosforilado (tirosina 705) se vieron modificados por la nutrición neonatal ($p < 0,05$) y por el tratamiento ($p < 0,01$), sin interacción entre los dos factores (figura 62.A). No hubo diferencias significativas entre los controles y las ratas con sobrepeso tratadas con vehículo. Los dos grupos de ratas (control y con sobrepeso) respondieron al tratamiento con leptina en este periodo temporal, incrementando los niveles de fosforilación de esta proteína respecto a sus controles (ANOVA $p < 0,05$), siendo este incremento superior en las hembras con sobrepeso tratadas con leptina respecto a los controles con el mismo tratamiento (ANOVA $p < 0,05$).

La cantidad relativa de Akt fosforilado se vio afectada por el tratamiento ($p < 0,05$) (figura 62.B). No hubo diferencias significativas entre los controles y las hembras con sobrepeso tratadas con vehículo. Únicamente las ratas control respondieron al tratamiento con leptina, viéndose disminuida la cantidad de Akt fosforilado respecto a las ratas tratadas con vehículo (ANOVA $p < 0,05$).

Los niveles relativos de ERK-2 fosforilado se modificaron a causa del tratamiento ($p < 0,01$) (figura 62.C). No hubo diferencias significativas entre las hembras control y con sobrepeso tratadas con vehículo. Los dos grupos respondieron al tratamiento con leptina disminuyendo los niveles de p-ERK-2 respecto a las ratas tratadas con vehículo (ANOVA $p < 0,01$), aunque en menor grado en las hembras con sobrepeso tratadas con leptina, donde la cantidad de p-ERK-2 era mayor que en los controles con el mismo tratamiento (ANOVA $p < 0,01$).

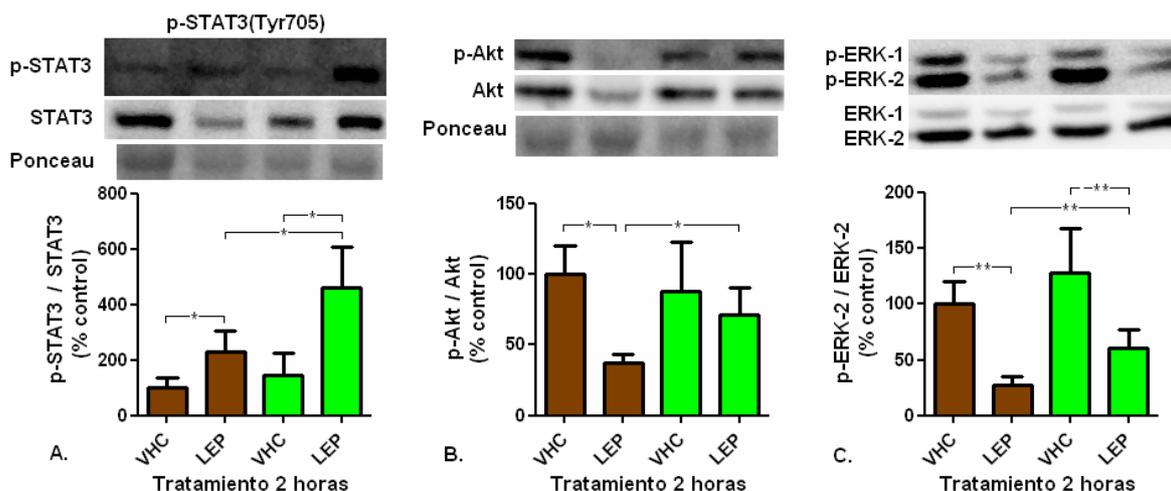


Figura 62. Niveles relativos de las proteínas de señalización por leptina en el hipotálamo modificados tras 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal en ratas hembra de día peripuberal 30 ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; Akt: proteína quinasa específica de serina/treonina; ERK: quinasa relacionada con señal extracelular; * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

En este periodo temporal no hubo efecto de la nutrición neonatal ni del tratamiento sobre la cantidad relativa de p-STAT3 (serina 727), p-JAK-2 y p-ERK-1 (figura 63).

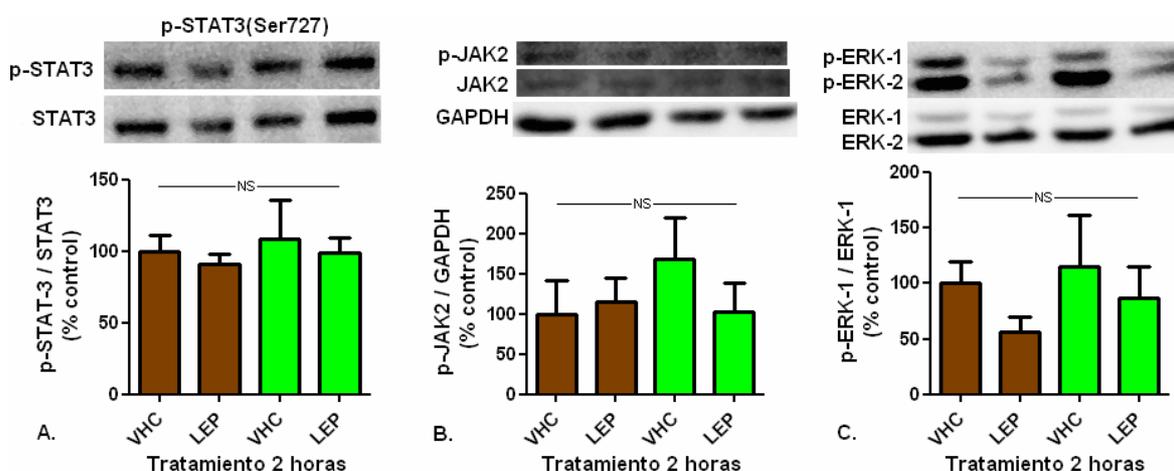


Figura 63. Niveles relativos de las proteínas de señalización por leptina en el hipotálamo no modificados tras 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal en ratas hembra de día peripuberal 30 ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; JAK2: Janus quinasa 2; ERK: quinasa relacionada con señal extracelular; NS: no significativo.

● Reguladores negativos de la señalización:

Los niveles de la isoforma de membrana de PTP1B se vieron afectados por el tratamiento ($p<0,05$) y por la interacción entre éste y la nutrición neonatal ($p<0,05$) (figura 64.A-C). No hubo diferencias significativas entre los controles y las ratas con sobrepeso tratadas con vehículo. Únicamente las hembras con sobrepeso respondieron al tratamiento con leptina, disminuyendo los niveles relativos de la isoforma de membrana de este regulador

negativo respecto de las tratadas con vehículo (ANOVA $p < 0,01$). Los niveles relativos de la isoforma citoplásmica no se vieron afectados por la nutrición neonatal ni por el tratamiento, probablemente debido a que existió mucha variabilidad en todos los grupos, sobre todo en las hembras con sobrepeso. El porcentaje de la isoforma de membrana fue superior en todos los grupos.

En las hembras control y con sobrepeso tratadas con vehículo no se detectó SOCS3. Sin embargo, ambos grupos respondieron a la administración de leptina incrementando los niveles de esta proteína, sin diferencias significativas entre ellos (figura 64.D).

No hubo efecto de la nutrición neonatal ni del tratamiento sobre la cantidad relativa de PTEN fosforilado (figura 64.E). Nótese la variabilidad en las ratas control tratadas con vehículo y en las ratas con sobrepeso tratadas con leptina.

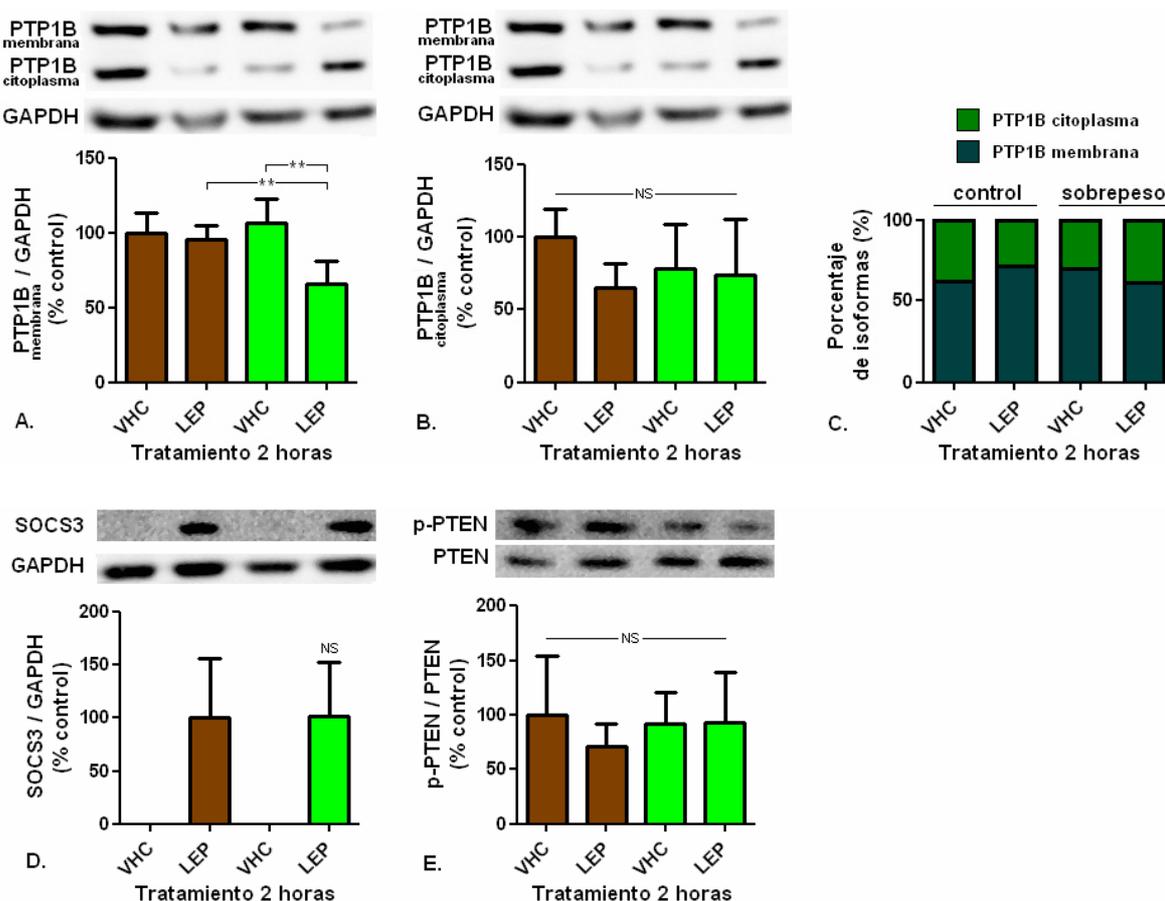


Figura 64. Niveles relativos de los reguladores negativos de la señalización por leptina en hipotálamo tras 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal en ratas hembra de día peripuberal 30 ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar (excepto gráfica C). ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B; SOCS3: supresor de la señalización por citoquinas 3; PTEN: homólogo de la fosfatasa y la tensina; GAPDH: gliceraldehído 3-fostato deshidrogenasa; p-: forma fosforilada; ** $p < 0,01$; NS: no significativo.

C) Día 35 – Machos – Leptina 45 minutos y 2 horas:

Los niveles circulantes de leptina se vieron modificados por la nutrición neonatal ($p < 0,01$) y el tratamiento ($p < 0,01$), con interacción de ambos factores ($p < 0,05$) (figura 65). A los 45 minutos del tratamiento con vehículo la concentración hormonal era mayor en los machos con sobrepeso respecto de los controles (ANOVA $p < 0,01$), manteniéndose sin cambios significativos en ambos grupos a las 2 horas, aunque en este momento sin diferencias significativas entre animales control y con sobrepeso. Los dos grupos respondieron al tratamiento con leptina, aumentando la concentración de la hormona en relación con sus respectivos controles tratados con vehículo (ANOVA $p < 0,01$), sin diferencias significativas entre ellos, y permaneciendo sin cambios a las 2 horas.

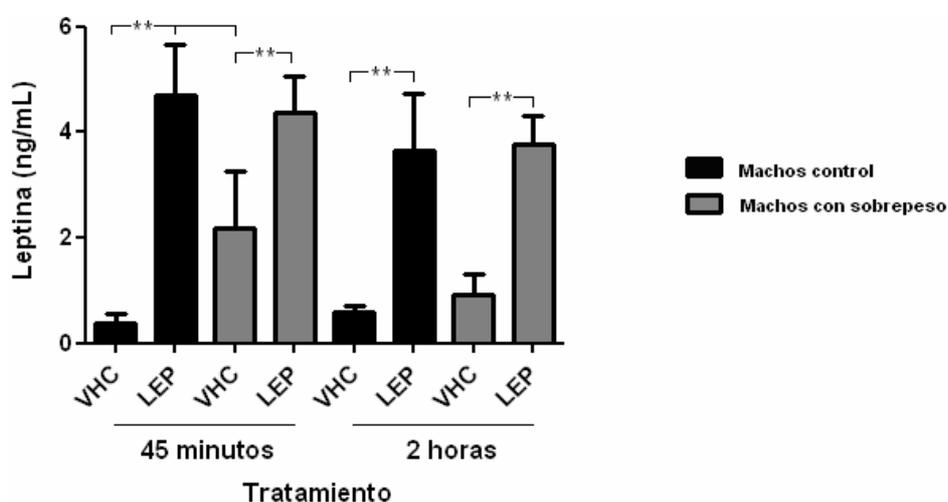


Figura 65. Leptina circulante en las ratas macho de día peripuberal 35 tras 45 minutos y 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. VHC: vehículo; LEP: leptina; ** $p < 0,01$.

Los niveles insulínicos no se vieron modificados por la nutrición neonatal, el tratamiento ni el tiempo (figura 66).

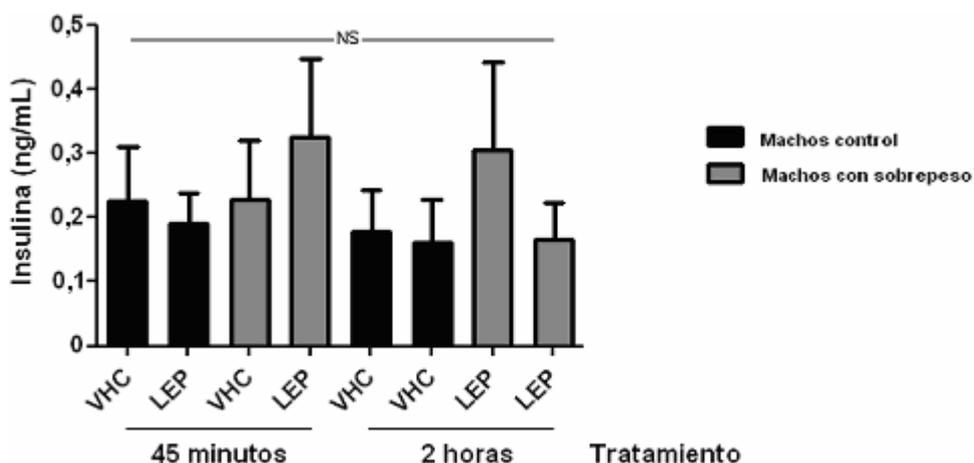


Figura 66. Insulina circulante en las ratas macho de día peripuberal 35 tras 45 minutos y 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. VHC: vehículo; LEP: leptina; NS: no significativo.

La concentración de la hormona luteinizante se vio afectada por la interacción entre la nutrición neonatal y el tratamiento ($p < 0,05$) (figura 67). A los 45 minutos del tratamiento con vehículo no se dieron cambios significativos entre los machos control y sobrepeso, manteniéndose de la misma forma a las 2 horas. Sólo los machos con sobrepeso respondieron al tratamiento con leptina, pero no a los 45 minutos, donde hubo mucha variabilidad, si no a las 2 horas, viéndose incrementada la concentración de la hormona luteinizante respecto de los machos con sobrepeso tratados con vehículo (ANOVA $p < 0,05$).

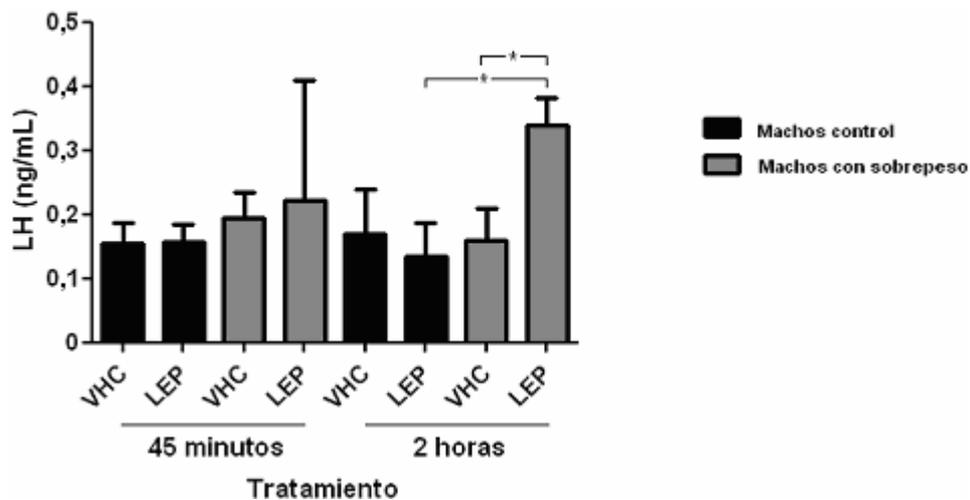


Figura 67. Hormona luteinizante (LH) circulante en las ratas macho de día peripuberal 35 tras 45 minutos y 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. VHC: vehículo; LEP: leptina; * $p < 0,05$.

Los niveles circulantes de testosterona no se modificaron por causa de la nutrición neonatal, el tratamiento ni el tiempo tras el tratamiento (figura 68).

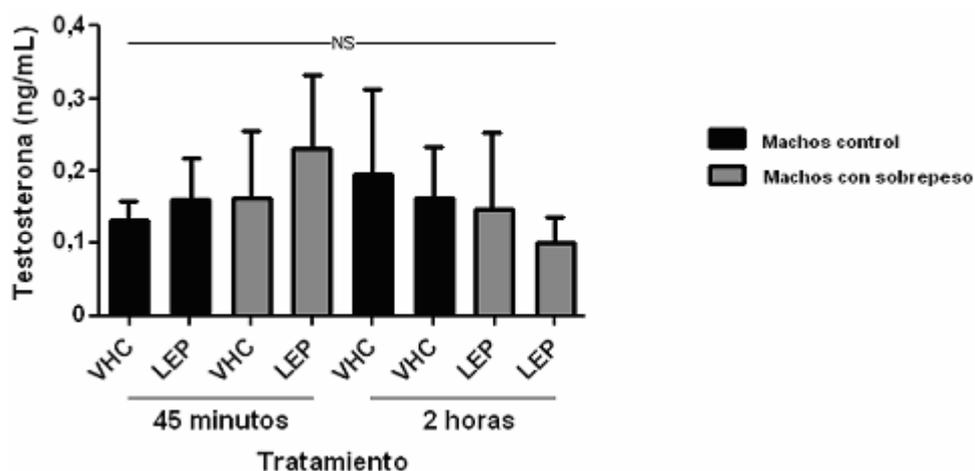


Figura 68. Testosterona circulante en las ratas macho de día peripuberal 35 tras 45 minutos y 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. VHC: vehículo; LEP: leptina; NS: no significativo.

C.1) Día 35 – Machos – Leptina 45 minutos:

● Proteínas de señalización:

En los machos control y con sobrepeso tratados con vehículo no se detectó STAT3 fosforilado en tirosina 705. Ambos grupos respondieron a la administración de leptina incrementando la fosforilación de esta proteína, sin diferencias significativas entre ellos (figura 69.A).

Los niveles relativos de JAK-2 fosforilado se vieron afectados por la nutrición neonatal ($p < 0,05$) (figura 69.B), siendo los niveles de esta proteína superiores en los machos con sobrepeso tratados con vehículo respecto a su control (ANOVA $p < 0,05$). En los machos con sobrepeso tratados con leptina no hubo diferencias significativas respecto a los controles con el mismo tratamiento.

La cantidad relativa de Akt fosforilado estuvo afectada por la nutrición neonatal ($p < 0,05$) (figura 69.C), estando los niveles de la misma disminuidos en los machos con sobrepeso tratados con vehículo y leptina en relación a sus respectivos controles (ANOVA $p < 0,05$).

No hubo efecto de la nutrición neonatal ni del tratamiento sobre la cantidad relativa de STAT3 fosforilado en serina 727 y de las proteínas p-ERKs (figura 70.A-C).

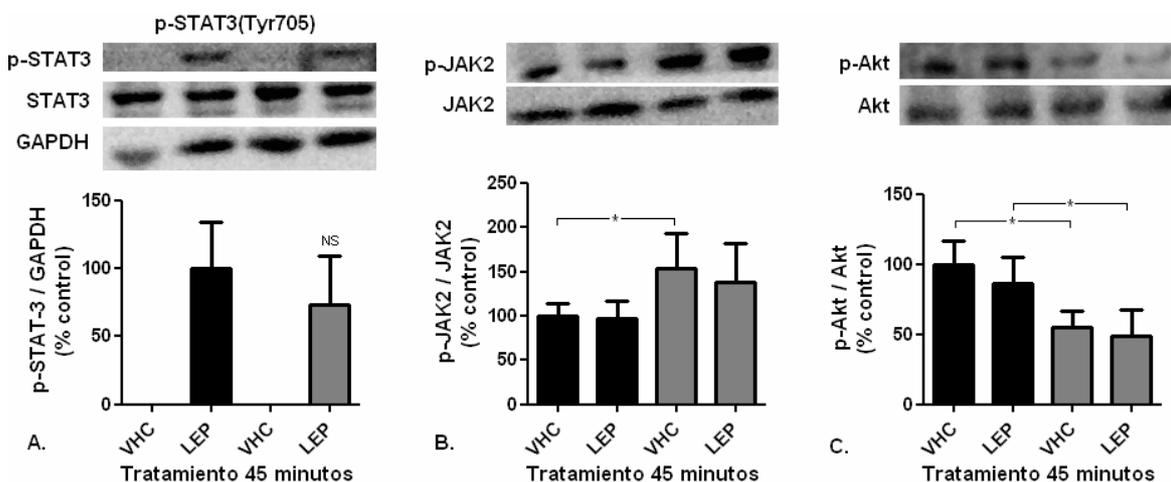


Figura 69. Niveles relativos de las proteínas de señalización por leptina en el hipotálamo modificados tras 45 minutos de la inyección de leptina intraperitoneal en ratas macho de día peripuberal 35 ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ▒ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; JAK2: Janus quinasa 2; Akt: proteína quinasa específica de serina/treonina; p-: forma fosforilada; * $p < 0,05$; NS: no significativo.

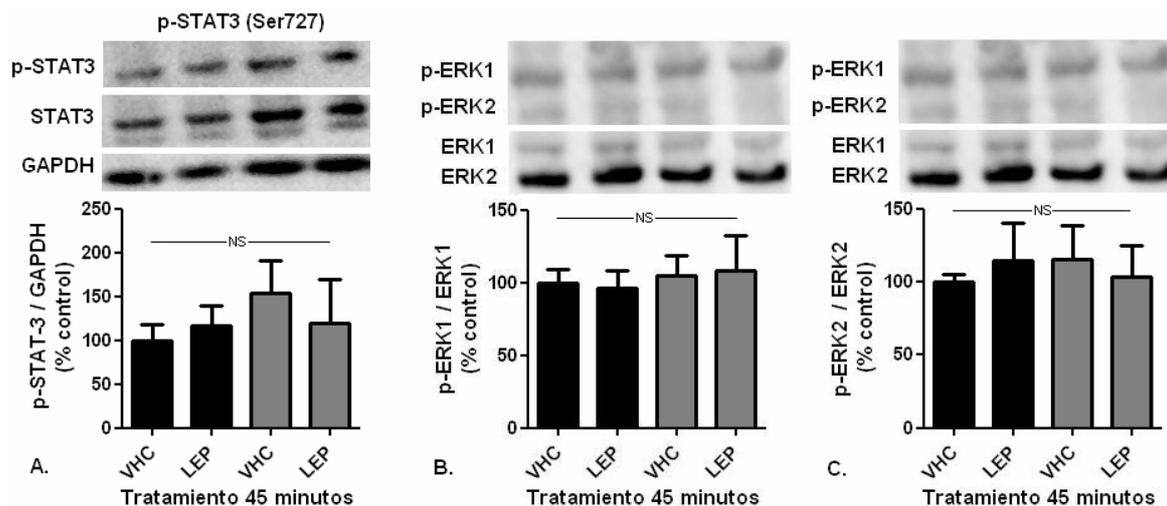


Figura 70. Niveles relativos de las proteínas de señalización por leptina en el hipotálamo no modificados tras 45 minutos de la inyección de leptina intraperitoneal en ratas macho de día peripuberal 35 (n=6). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; ERK: quinasa relacionada con señal extracelular; p-: forma fosforilada; NS: no significativo.

● Reguladores negativos de la señalización:

No hubo efecto de la nutrición neonatal ni del tratamiento sobre los niveles relativos de SOCS3, PTP1B y PTEN fosforilado (figura 71).

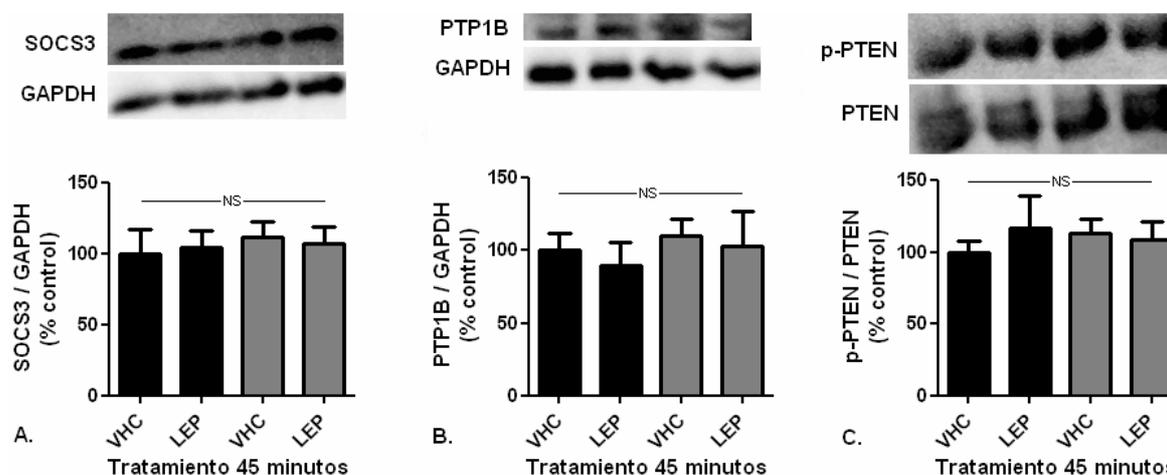


Figura 71. Niveles relativos de los reguladores negativos de la señalización por leptina en hipotálamo tras 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal en ratas hembra de día peripuberal 30 (n=6). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; SOCS3: supresor de la señalización por citoquinas 3; PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B; PTEN: homólogo de la fosfatasa y la tensina; GAPDH: gliceraldehído 3-fostato deshidrogenasa; p-: forma fosforilada; NS: no significativo.

C.2) Día 35 – Machos – Leptina 2 horas:

● Proteínas de señalización:

Los niveles de STAT3 fosforilado en el residuo de tirosina 705 se vieron modificados por el tratamiento ($p < 0,01$) (figura 72.A), de tal manera que no existieron diferencias

significativas entre los machos control y con sobrepeso tratados con vehículo, pero ambos grupos respondieron al tratamiento con leptina incrementando la cantidad de p-STAT3 respecto a las ratas tratadas con vehículo (ANOVA $p < 0,01$), sin diferencias significativas entre ellos.

La cantidad relativa de p-JAK2 estuvo modificada por la interacción entre la nutrición neonatal y el tratamiento ($p < 0,05$) (figura 72.B). No hubo diferencias significativas entre los controles y las ratas con sobrepeso tratadas con vehículo. Solamente los machos con sobrepeso respondieron al tratamiento con leptina incrementando la cantidad de p-JAK2 respecto a los machos con sobrepeso tratados con vehículo (ANOVA $p < 0,05$).

En las proteínas de señalización STAT3 fosforilada en serina 727, p-Akt y p-ERKs no hubo efecto de la nutrición neonatal ni del tratamiento (figuras 72.C-F).

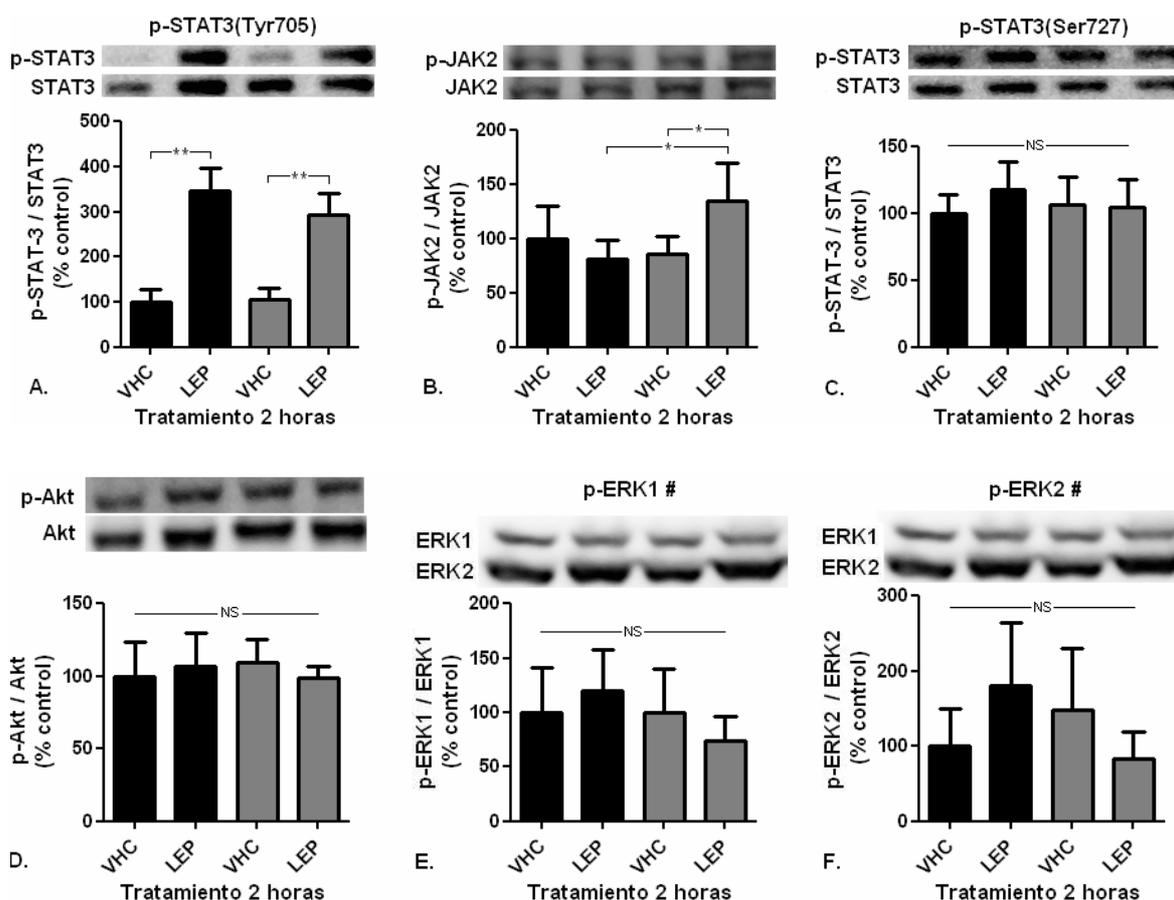


Figura 72. Niveles relativos de las proteínas de señalización por leptina en el hipotálamo tras 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal en ratas macho de día peripuberal 35 ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; JAK2: Janus quinasa 2; Akt: proteína quinasa específica de serina/treonina; ERK: quinasa relacionada con señal extracelular; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NS: no significativo. #: los geles de p-ERK1/2 no se muestran ya que no son representativos debido a su considerable variabilidad.

● Reguladores negativos de la señalización:

No hubo efecto de la nutrición neonatal ni del tratamiento con leptina sobre los niveles relativos de SOCS3, PTP1B y PTEN fosforilado (figura 73).

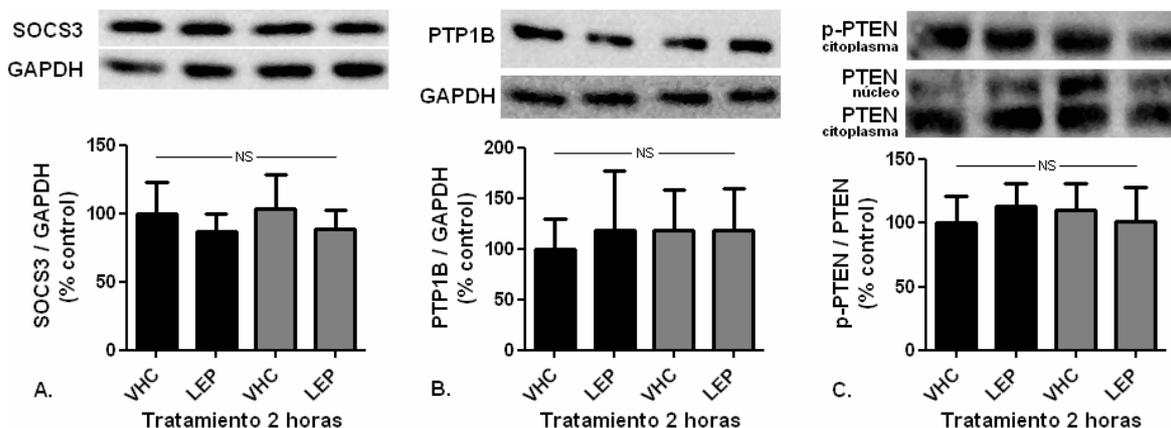


Figura 73. Niveles relativos de los reguladores negativos de la señalización por leptina en hipotálamo tras 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal en ratas hembra de día peripuberal 30 (n=6). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; SOCS3: supresor de la señalización por citoquinas 3; PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B; PTEN: homólogo de la fosfatasa y la tensina; GAPDH: gliceraldehído 3-fostato deshidrogenasa; p-: forma fosforilada; NS: no significativo.

2.3. Efecto del tratamiento agudo con leptina sobre la expresión génica en el hipotálamo

A) Día 30 – Hembras – Leptina 2 horas:

La expresión génica de NPY, relacionado con la promoción de la ingesta, estuvo afectada por la nutrición neonatal ($p < 0,05$) y por el tratamiento ($p < 0,01$), sin interacción entre los dos factores (figura 74.A). Las hembras con sobrepeso tratadas con vehículo tenían más ARNm que sus controles (ANOVA $p < 0,05$). Ambos grupos de ratas, control y sobrepeso, respondieron al tratamiento con leptina disminuyendo la expresión génica de NPY respecto a las ratas tratadas con vehículo (ANOVA $p < 0,05$), más acusadamente en las hembras con sobrepeso, donde la cantidad de ARNm disminuyó a niveles similares a los controles. La expresión génica del neuropéptido AgRP, también relacionado con el incremento de la ingesta, no se vio afectada por la nutrición neonatal ni por el tratamiento (figura 74.B).

La expresión génica de POMC, implicado en la supresión de la ingesta, se modificó a causa de la nutrición neonatal ($p < 0,01$) y del tratamiento ($p < 0,01$), con interacción entre los dos factores ($p < 0,05$) (figura 74.C). Así pues, no hubo diferencias significativas entre las hembras control y con sobrepeso tratadas con vehículo. Los dos grupos respondieron al tratamiento con leptina incrementando la cantidad de ARNm de POMC respecto a las ratas

tratadas con vehículo (ANOVA $p < 0,01$), siendo este incremento mayor en las hembras con sobrepeso respecto a las control (ANOVA $p < 0,01$).

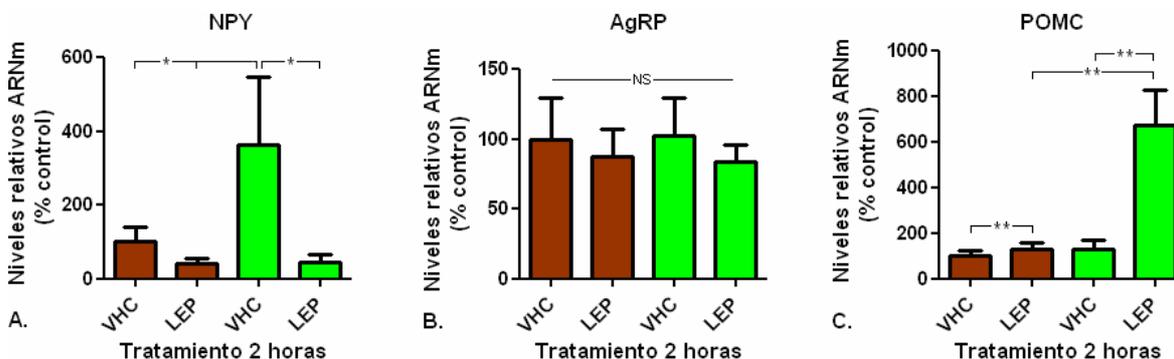


Figura 74. Expresión génica en hipotálamo de ratas hembra de día peripuberal 30 tras 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; NPY: neuropéptido Y; AgRP: proteína relacionada con agouti; POMC: pro-opiomelanocortina; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NS: no significativo.

La expresión génica del receptor de leptina estuvo modificada por la sobrenutrición neonatal ($p < 0,05$) (figura 75.A). No hubo cambios en los niveles de ARNm entre las hembras control y con sobrepeso tratadas con vehículo. Sólo las hembras con sobrepeso respondieron al tratamiento con leptina aumentando los niveles relativos de ARNm respecto a las mismas tratadas con vehículo (ANOVA $p < 0,05$).

La expresión génica de BDNF estuvo afectada por el tratamiento ($p < 0,05$) (figura 75.B). Las hembras con sobrepeso tratadas con vehículo tuvieron una menor cantidad de ARNm respecto a sus controles (ANOVA $p < 0,05$). Solamente las hembras con sobrepeso respondieron al tratamiento con leptina aumentando los niveles de ARNm de BDNF respecto a las hembras con sobrepeso tratadas con vehículo (ANOVA $p < 0,05$).

La expresión génica de GnRH se vio afectada por la interacción entre la nutrición neonatal y el tratamiento ($p < 0,05$) (figura 75.C). No hubo cambios en los niveles de ARNm entre las hembras control y con sobrepeso tratadas con vehículo o con leptina. Sin embargo, las hembras con sobrepeso tratadas con leptina tenían unos niveles inferiores de ARNm respecto a las hembras control con el mismo tratamiento (ANOVA $p < 0,05$).

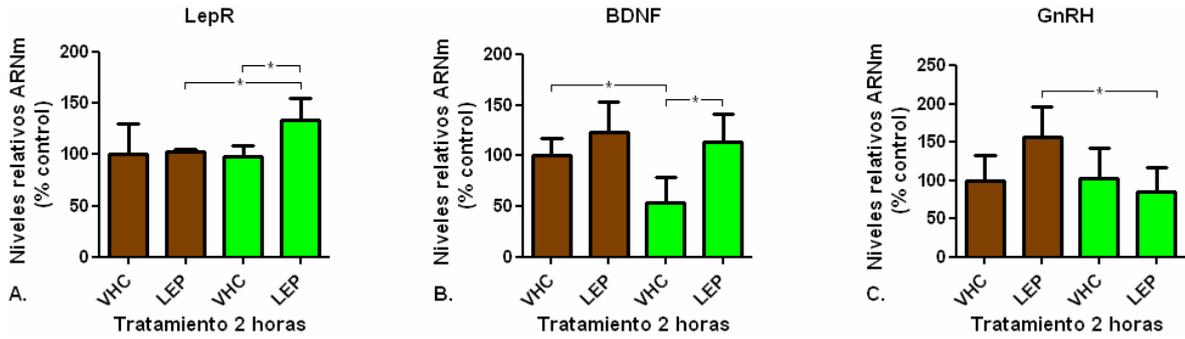


Figura 75. Expresión génica en hipotálamo de ratas hembra de día peripuberal 30 tras 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; LepR: receptor de leptina; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; GnRH: hormona liberadora de gonadotropina; * $p<0,05$.

No hubo efecto de la nutrición neonatal ni del tratamiento en la expresión génica de kisspeptina, de su receptor y del factor de crecimiento similar a la insulina-I (figura 76). Hay que destacar que existió variabilidad en la expresión de kisspeptina en las hembras con sobrepeso tratadas con leptina, además de en la expresión génica de IGF-I en las hembras control tratadas con vehículo y en las hembras con sobrepeso tratadas con leptina.

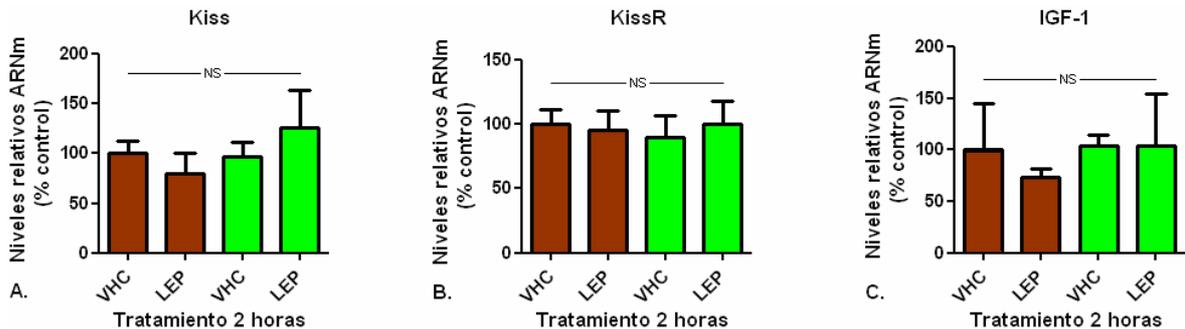


Figura 76. Expresión génica en hipotálamo de ratas hembra de día peripuberal 30 tras 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal ($n=6$). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; Kiss: kisspeptina; KissR: receptor de kisspeptina; IGF-I: factor de crecimiento similar a la insulina-I; NS: no significativo.

B) Día 35 – Machos – Leptina 2 horas:

No hubo efecto de la nutrición neonatal ni del tratamiento en la expresión génica de ninguno de los neuropéptidos, receptores, hormonas y factores estudiados (figura 77).

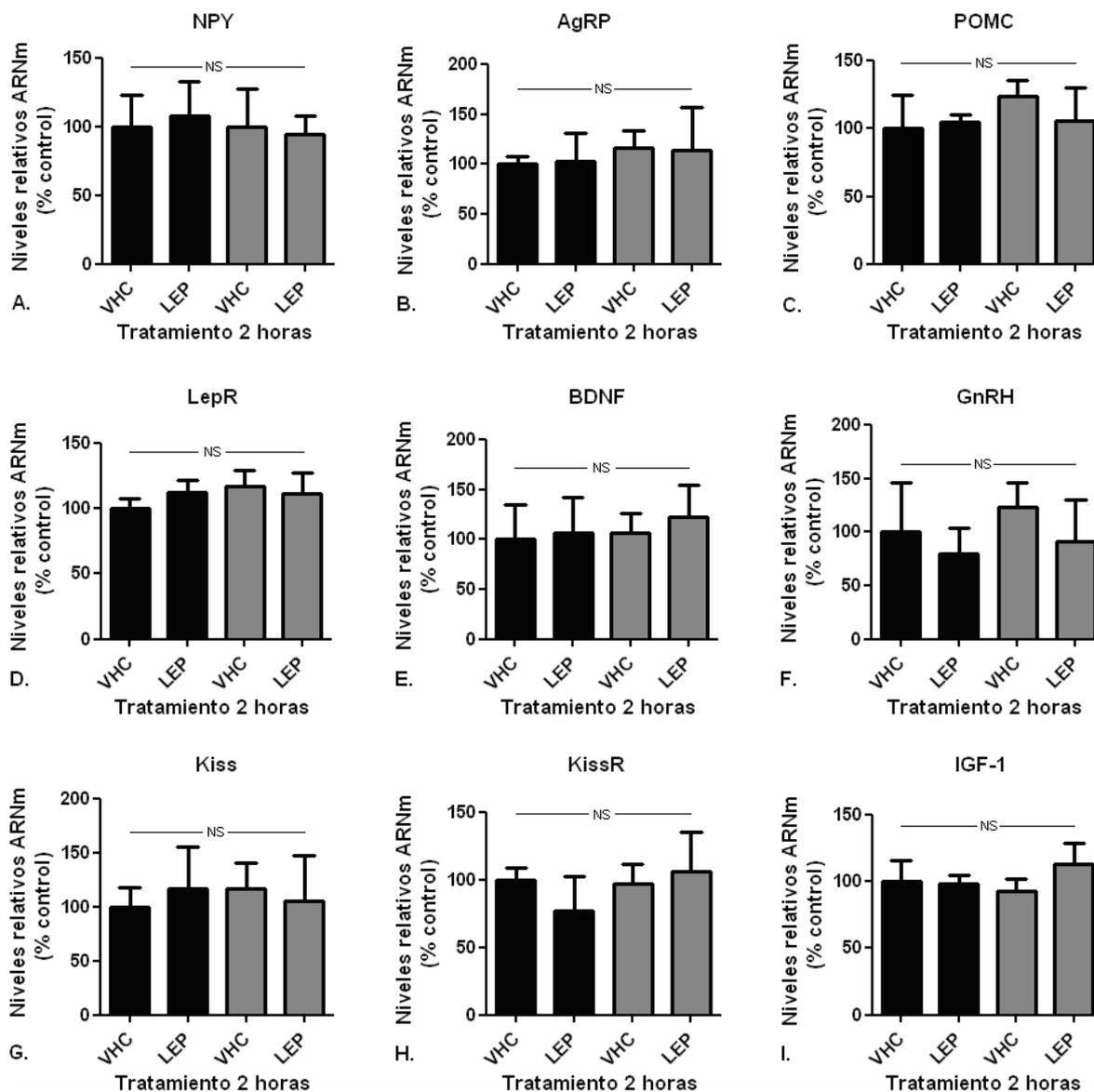


Figura 77. Expresión génica en hipotálamo de ratas macho de día peripuberal 35 tras 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal (n=6). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ▒ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; NPY: neuropéptido Y; POMC: pro-opiomelanocortina; AgRP: proteína relacionada con agouti; LepR: receptor de leptina; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; GnRH: hormona liberadora de gonadotropina; Kiss: kisspeptina; KissR: receptor de kisspeptina; IGF-I: factor de crecimiento similar a la insulina-I; NS: no significativo.

2.4. Efecto del tratamiento agudo con leptina sobre la expresión génica en la hipófisis

A) Día 30 – Hembras – Leptina 2 horas:

No hubo efecto de la nutrición neonatal ni del tratamiento en la expresión génica de las hormonas estudiadas: luteinizante, folículo estimulante, del crecimiento y estimulante de la tiroides (figura 78).

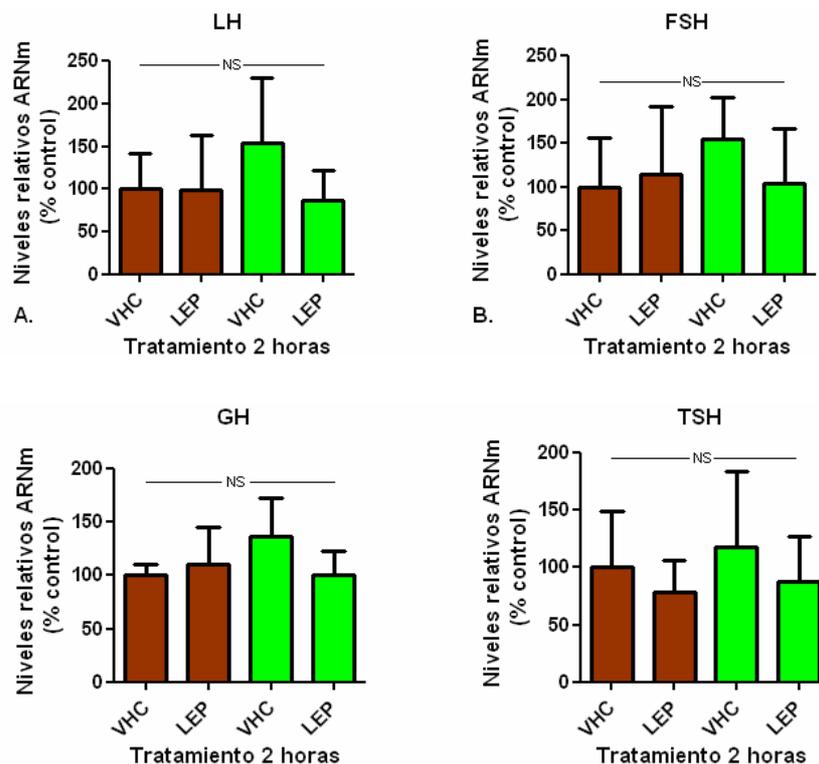


Figura 78. Expresión génica en hipófisis de ratas hembra de día peripuberal 30 tras 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal (n=6). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona folículo estimulante; GH: hormona del crecimiento; TSH: hormona estimulante de la tiroides; NS: no significativo.

B) Día 35 – Machos – Leptina 2 horas:

La expresión génica de la hormona luteinizante se vio afectada por la nutrición neonatal ($p < 0,05$) (figura 79.A). Los machos con sobrepeso tratados con vehículo tuvieron unos niveles relativos de ARNm superiores a sus controles (ANOVA $p < 0,05$). Después del tratamiento con leptina, solamente las ratas con sobrepeso respondieron disminuyendo los niveles de ARNm respecto a las ratas con sobrepeso tratadas con vehículo (ANOVA $p < 0,05$).

La expresión génica de las hormonas folículo estimulante, del crecimiento y estimulante de la tiroides no se vio afectada por la nutrición neonatal ni por el tratamiento, existiendo cierta variabilidad en los niveles relativos de ARNm (figura 79.B-D).

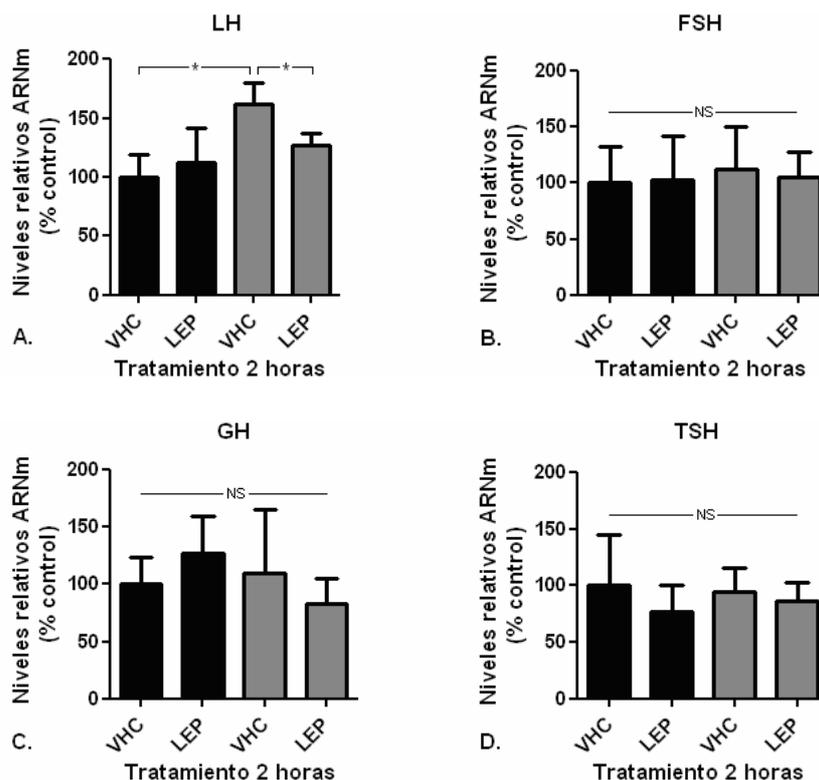


Figura 79. Expresión génica en hipófisis de ratas macho de día peripuberal 35 tras 2 horas de la inyección de leptina intraperitoneal (n=6). Valores representados como media \pm error estándar. ■ control; ■ sobrepeso; VHC: vehículo; LEP: leptina; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona folículo estimulante; GH: hormona del crecimiento; TSH: hormona estimulante de la tiroides; * $p < 0,05$; NS: no significativo.

2.5. Resumen de los efectos de la sobrenutrición neonatal y de la administración aguda de leptina en los animales del modelo de sobrepeso prepuberal

En las tablas 13 a 16 se muestra un resumen de los efectos producidos por la sobrenutrición neonatal en los dos sexos, con el consiguiente desarrollo de sobrepeso, y la administración aguda de leptina.

Tabla 13. Efectos de la sobrenutrición neonatal sobre los parámetros morfológicos y la ingesta de las ratas del modelo de sobrepeso prepuberal. M: machos; H: hembras; ↑ incremento respecto al control; = sin cambios significativos; * sin dimorfismo sexual en ningún parámetro.

Día	21*		22	25	30	22	25	30	35
Parámetro / Sexo	M	H	H	H	H	M	M	M	M
Peso	↑	↑	=	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Longitud	↑	↑	=	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Ingesta				=	↑		↑	↑	=
Grasa subcutánea abdominal relativa	↑	↑			=				=
Grasa visceral perigonadal relativa	↑	↑			=				↑
Grasa parda relativa	↑	↑			=				=
Peso relativo gónadas	=	↑			=				↑

Tabla 14. Efectos de la inyección intraperitoneal de leptina sobre los niveles hormonales circulantes de las ratas del modelo de sobrepeso prepuberal. M: machos; H: hembras; C: control; S: sobrepeso; HOMA-IR: índice de resistencia a la insulina mediante evaluación del modelo homeostático; LH: hormona luteinizante; ↑ incremento respecto a las ratas del mismo grupo tratadas con vehículo (flecha roja: incremento respecto a las ratas del otro grupo tratadas con leptina); ↓ disminución respecto a las ratas del mismo grupo tratadas con vehículo; = sin cambios significativos.

Día – tiempo	21 – 45'		21 – 45'		30 – 45'		30 – 2h		35 – 45'		35 – 2h	
Sexo	M		H		H		H		M		M	
Parámetro / Grupo	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
Leptina	↑	↑	↑	↑	↑	↑	=	↑	↑	↑	↑	↑
Glucosa	=	=	=	=								
Insulina	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
HOMA-IR	=	=	=	=								
LH	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↑
Testosterona	↑	↓							=	=	=	=
Estradiol					=	=	=	=				

Tabla 15. Efectos de la inyección intraperitoneal de leptina sobre las proteínas de la ruta de señalización intracelular por leptina en el hipotálamo de las ratas del modelo de sobrepeso prepuberal. M: machos; H: hembras; C: control; S: sobrepeso; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; JAK2: Janus quinasa 2; Akt: proteína quinasa específica de serina/treonina; ERK: quinasa relacionada con señal extracelular; SOCS3: supresor de la señalización por citoquinas 3; PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B; PTEN: homólogo de la fosfatasa y la tensina; p-: forma fosforilada; ↑ incremento respecto a las ratas del mismo grupo tratadas con vehículo; ↓ disminución respecto a las ratas del mismo grupo tratadas con vehículo; flecha roja: incremento o disminución respecto a las ratas del otro grupo tratadas con leptina; = sin cambios significativos.

Día – tiempo	21 – 45'		21 – 45'		30 – 45'		30 – 2h		35 – 45'		35 – 2h	
Sexo	M		H		H		H		M		M	
Parámetro / Grupo	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
p-STAT3 tirosina 705	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
p-STAT3 serina 727	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
p-JAK2	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↑
p-Akt	↓	↑	=	↑	=	=	↓	=	=	=	=	=
p-ERK1	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
p-ERK-2	=	=	=	=	=	↑	↓	↓	=	=	=	=
SOCS3	=	=	=	=	=	=	↑	↑	=	=	=	=
PTP1B (membrana)	=	=	=	=	↓	=	=	↓	=	=	=	=
PTP1B (citoplasma)	=	=	=	=	↓	=	=	=	=	=	=	=
p-PTEN	=	↓	=	=	=	=	↑	↑	=	=	=	=

Tabla 16. Efectos de la inyección intraperitoneal de leptina sobre la expresión génica en el hipotálamo de las ratas del modelo de sobrepeso prepuberal. M: machos; H: hembras; C: control; S: sobrepeso; NPY: neuropéptido Y; AgRP: proteína relacionada con agouti; POMC: pro-opiomelanocortina; LepR: receptor de leptina; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; GnRH: hormona liberadora de gonadotropina; Kiss: kisspeptina; KissR: receptor de kisspeptina; IGF-I: factor de crecimiento similar a la insulina-I; ↑ incremento respecto a las ratas del mismo grupo tratadas con vehículo (flecha roja: incremento respecto a las ratas del otro grupo tratadas con leptina); ↓ disminución respecto a las ratas del mismo grupo tratadas con vehículo; = sin cambios significativos.

Día – tiempo 2h	30		35	
Sexo	H		M	
Parámetro / Grupo	C	S	C	S
NPY	↓	↓	=	=
AgRP	=	=	=	=
POMC	↑	↑	=	=
LepR	=	↑	=	=
BDNF	=	↑	=	=
GnRH	=	=	=	=
Kiss	=	=	=	=
KissR	=	=	=	=
IGF-1	=	=	=	=

IV. Discusión

1. Consideraciones sobre los modelos experimentales

El modelo de sobrenutrición durante la vida postnatal temprana se ha utilizado para simular la alteración de las condiciones metabólicas que puede darse en fases avanzadas de la gestación en humanos [42]. De hecho, gran parte de la maduración neuroendocrina que en primates sucede en las etapas finales de la vida intrauterina, en los roedores tiene lugar durante el periodo postnatal temprano [42, 265]. Así pues, este modelo de manipulación nutricional en la etapa postnatal es muy apropiado para analizar condiciones neuroendocrinas alteradas de especial interés.

En primer lugar, se estudió el efecto de la sobrenutrición neonatal sobre parámetros hormonales, proteínas hipotalámicas involucradas en la señalización por leptina y sobre la expresión génica hipofisaria a lo largo del desarrollo de ratas de ambos sexos: días 10 (pico fisiológico de leptina), 21 (destete), 30 (peripuberal), 50 (postpuberal) y 85 (adulto joven).

Posteriormente, para estudiar la sensibilidad hipotalámica a la leptina en la edad prepuberal, se llevó a cabo un modelo experimental en el que se ha estudiado el efecto de un aumento agudo de leptina en individuos de ambos sexos en dos etapas. Una etapa temprana del periodo prepuberal, marcada por el día 21 de vida en los dos sexos, y otra etapa final del periodo prepuberal, determinada por el día 30 ó 35 en las hembras y los machos, respectivamente. Para establecer las respuestas centrales que induce la leptina en los animales sobrenutridos neonatalmente, tanto de manera fisiológica como a corto plazo tras la administración de la hormona, se estudiaron las rutas de señalización intracelular y la expresión génica en el hipotálamo, el área integradora de las señales que modulan la homeostasis y promueven la entrada en pubertad, así como la expresión génica en la hipófisis, cuya activación por parte del hipotálamo es clave en el comienzo de la pubertad [203].

Es importante resaltar que en estos modelos fisiológicos basados en la sobrenutrición neonatal, donde se dan cambios substanciales en el peso de los animales en periodos temporales más o menos tempranos, no siempre esos cambios han estado asociados con un incremento significativo en la concentración circulante de leptina, como así sucede en estudios de nuestro grupo de investigación con este modelo experimental [266-268], probablemente debido a que algunos animales no sean tan susceptibles como otros a esos cambios, e incluso hayan influido diferencias en los puntos experimentales de estudio o la época de año en la que se desarrollaron los modelos animales, lo que está relacionado con las variaciones que se dan en los ritmos circadianos de las ratas en las distintas estaciones, y que se sabe que modifican distintos parámetros hormonales [269]. En relación con este

hecho, cabe mencionar que los modelos de este estudio se desarrollaron, prácticamente en su totalidad, en las épocas de otoño e invierno, aunque con un año de diferencia entre los animales del modelo de desarrollo y el resto.

2. Cambios durante el desarrollo

La obesidad está relacionada con una modificación de la dinámica de los procesos implicados en el desarrollo evolutivo, como consecuencia de un incremento en la carga alostática de los mecanismos de homeostasis reguladores del balance energético [270, 271]. Una pregunta relevante, aún por dilucidar, es cómo la obesidad contribuye a la modificación de muchos de los procesos neuroendocrinos y metabólicos que tienen lugar durante la vida postnatal, especialmente en etapas cruciales como la pubertad, y que determinan el desarrollo y progresión de patologías tales como diabetes, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, hipercolesterolemia y algunos tipos de cáncer [272, 273].

2.1. Composición corporal y cambios hormonales

A lo largo de las diferentes etapas de la vida postnatal se van produciendo una serie de cambios histológicos, metabólicos y endocrinos en el tejido adiposo, determinados por la capacidad de éste para diferenciar nuevos adipocitos una vez que se llega a la hipertrofia celular, la competencia para producir quimiocinas y la variación en el patrón de secreción de adipoquinas [154-156]. Distintos estudios en modelos animales y en cultivos *in vitro* indican que los preadipocitos sufren una reducción en la acumulación de lípidos y en la actividad de las enzimas lipogénicas con la edad, así como una disminución en la expresión de genes implicados en la diferenciación de estas células, especialmente PPAR- γ y SREBP-1 [274-276]. La disminución en la diferenciación de los adipocitos, especialmente en el tejido adiposo blanco, puede inducir una reducción en el tamaño de determinados depósitos de grasa y la redistribución de la misma hacia otros tejidos adiposos y no adiposos [271, 275].

Depósitos de grasa y señales de adiposidad:

A pesar de que se desconocen muchos mecanismos subyacentes, se ha comprobado que durante el desarrollo normal de las ratas, en el que se produce un incremento gradual de peso y longitud, con diferencias sexuales a partir de la entrada en pubertad; la grasa subcutánea tiende a disminuir en el periodo prepuberal, coincidiendo con unos depósitos de grasa corporal mínimos antes de la entrada en pubertad [277], volviendo a aumentar postpuberalmente; mientras que la grasa visceral aumenta progresivamente durante toda la vida postnatal [278], como así sucede en los animales con peso normal de este estudio.

La leptina, entre cuyas funciones está la regulación directa del metabolismo del tejido adiposo inhibiendo la lipogénesis y estimulando la lipólisis [279], presenta, en roedores, un pico de producción por la noche, coincidiendo con la mayor ingesta de alimentos, mientras que disminuye durante el día [280]. Esta hormona se sintetiza y secreta en relación directa con los depósitos de grasa, especialmente la grasa subcutánea, en la cual la tasa de secreción y de expresión génica de la leptina es entre dos y tres veces mayor que en la grasa visceral, en parte debido a que el tamaño de los adipocitos es mayor en la grasa subcutánea respecto a la visceral [278]. La leptina circulante muestra un pico en la vida postnatal temprana, alrededor del día 4, que puede llegar, aproximadamente, hasta el día postnatal 10 [281]. Este incremento en la concentración plasmática se debe no sólo a la hormona sintetizada de manera endógena, si no que también guarda relación con la leptina transferida a través de la placenta y la que está presente en la leche materna [281]. A continuación, durante el periodo prepuberal, se produce una disminución en los niveles circulantes de esta hormona, que vuelven a aumentar postpuberalmente [278], del mismo modo que en las ratas con peso normal de este trabajo.

En roedores, al contrario de lo que sucede en humanos, los machos tienen niveles circulantes de leptina superiores a las hembras durante toda la vida postnatal [282]. Los machos con peso normal del presente trabajo no tuvieron significativamente más leptina circulante que las hembras con peso normal hasta el punto experimental 85, aunque se podía apreciar una tendencia en este sentido en todos los puntos temporales. La falta de significación, causada por la variabilidad en el resultado de las determinaciones hormonales, puede deberse al estrés inherente en la manipulación de los animales, a pesar de haber tratado de minimizar en todo lo posible este hecho, lo cual se sabe que puede provocar pequeñas variaciones en los parámetros hormonales, con respuestas diferenciales en machos y hembras, principalmente en animales de corta edad [283]. En un trabajo de Diéguez y colaboradores [284] donde compararon las concentraciones circulantes de leptina en distintas etapas de la vida postnatal de ratas de ambos sexos con los mismos pesos, observaron que los niveles de leptina en las hembras eran superiores o no presentaban diferencias significativas respecto a los de los machos en ninguno de los periodos estudiados, sugiriendo que las hormonas sexuales podrían regular los niveles de leptina directamente o como consecuencia de cambios en el peso corporal. No obstante, la posterior falta de reproducibilidad en los resultados de ese trabajo invita a pensar que en el presente estudio no se estaría dando una situación similar.

Los niveles de insulina y la resistencia a su acción también están correlacionados directamente con la adiposidad corporal, especialmente con la grasa visceral, aunque también con la subcutánea [285]. De la misma forma, la insulinemia y los niveles circulantes de leptina

están directamente relacionados, pudiendo regular la insulina estos últimos tanto a corto como a largo plazo, actuando directamente sobre los adipocitos para incrementar la síntesis y secreción de leptina [285]. Así pues, los niveles insulínicos y la resistencia a su acción en los animales con peso normal de ambos sexos siguieron el mismo patrón fluctuante que los niveles circulantes de leptina, sin dimorfismo sexual en ningún punto, disminuyendo en el periodo prepuberal, y volviendo a incrementar postpuberalmente, tal y como se ha demostrado en diferentes trabajos [286, 287].

Estos cambios tan relevantes durante la vida postnatal en la acumulación y redistribución de la grasa corporal, así como en las señales de adiposidad, encargadas de informar al cerebro de la distribución y las variaciones en el estado metabólico, son considerados de gran importancia desde un punto de vista fisiológico, ya que podrían ser la base de una amplia gama de patologías [288]. Una importante relación causa-efecto entre la distribución de la grasa y el síndrome metabólico reside en la acumulación de lípidos en órganos y tejidos no adiposos: páncreas, hígado, riñones, músculo esquelético, corazón o vasos sanguíneos [289]. En ellos se requiere, normalmente, una pequeña reserva intracelular de lípidos para funciones esenciales de mantenimiento de la estructura y fluidez de la membrana, así como para la señalización intracelular [271]. En situaciones de sobrecarga lipídica, como sucede de manera fisiológica con el avance de la edad, puede producirse una disfunción e inducirse una muerte celular programada en estos tejidos, denominada lipotoxicidad [271]. Distintos trabajos de investigación han demostrado que este proceso está muy relacionado con el aumento de la ingesta y la disminución del gasto energético, que tienen lugar de manera progresiva a lo largo de la vida postnatal, especialmente en la edad adulta y en los machos [271, 290].

La lipotoxicidad no sólo puede resultar de la sobrecarga lipídica inducida por el exceso de ácidos grasos en relación con la oxidación de los mismos presentes en forma libre en la circulación, si no que también se puede deber a la lipogénesis *de novo* que ocurre en los adipocitos o en los tejidos no adiposos como consecuencia de un incremento de la glucosa disponible, ya sea a través de la dieta o proveniente de la alimentación materna [271]. Este proceso, además, puede estar relacionado con un fallo en la señalización por leptina a nivel hipotalámico y/o periférico, y con la alteración de la capacidad de expansión del tejido adiposo blanco; factores que se han relacionado con el incremento en la ganancia de peso en edades muy avanzadas [290-292].

Hormona del crecimiento:

Esta hormona es capaz, a lo largo del desarrollo postnatal, de regular el metabolismo adipocítico mediante estimulación de la lipólisis, siguiendo un patrón de expresión creciente,

con un incremento muy importante a partir de la entrada en pubertad [293]. En los animales con peso normal de este estudio se podía apreciar una tendencia a incrementar en esa etapa; sin embargo, no hubo diferencias significativas a causa de la variabilidad que existió, probablemente, por la misma causa apuntada anteriormente [283], y/o por el patrón variable durante el día en la expresión de la hormona. Se ha comprobado que en los machos, los niveles basales de la hormona del crecimiento son bajos y presentan unos picos de secreción de gran amplitud cada 3 horas aproximadamente, mientras que en las hembras el patrón pulsátil no está tan normalizado, con niveles basales elevados y picos de secreción de menor amplitud [294]. Esto se traduce, desde un punto de vista fisiológico, en diferencias sexuales en el crecimiento lineal y en el metabolismo de esteroides en el hígado [295, 296], presentando los machos una mayor longitud, ya que su patrón pulsátil es más eficiente para promover el crecimiento longitudinal [297]. El patrón de secreción sexualmente dimórfico de la hormona del crecimiento está relacionado con el papel que los esteroides gonadales ejercen en etapas postnatales tempranas, en combinación con el efecto que éstos tienen en el periodo postpuberal, y que determinan la síntesis de hormonas y la composición celular de la hipófisis anterior [298, 299].

La expresión hipofisaria de la hormona del crecimiento en la edad adulta (día 85) fue diferente en los dos sexos. En las hembras aumentó la expresión significativamente, siguiendo la tendencia del periodo anterior. Este hecho puede estar relacionado, posiblemente, con el incremento en la expresión del receptor de leptina en el hipotálamo a partir del día 51 de vida, con el consiguiente incremento en la actividad reguladora de la hormona adipocítica, la cual se sabe que ejerce un importante efecto modulador en la expresión y secreción de la hormona del crecimiento a través de su acción sobre la expresión de la hormona liberadora de la hormona del crecimiento y la somatostatina [300-302]. En los machos sucedió lo contrario, disminuyendo la expresión de la hormona del crecimiento en esta edad. Diferentes estudios señalan que la expresión y secreción de la hormona del crecimiento disminuyen en la edad adulta, principalmente a partir de edades similares a la del presente trabajo [303-305], lo que está en consonancia con ese patrón de expresión visto en los machos.

Hormona estimuladora de la tiroides:

La glándula tiroides es la encargada de producir tiroxina, triyodotironina y la forma inversa de ésta, las cuales están implicadas, entre otras funciones, en el crecimiento corporal y en la organogénesis del sistema nervioso central [306]. El funcionamiento de esta glándula está controlado por el hipotálamo y la hipófisis, a través de las hormonas liberadora de tirotrópina y estimuladora de la tiroides (TSH), respectivamente [306]. El incremento durante la vida postnatal en las concentraciones circulantes de testosterona en los machos y estradiol

en las hembras, podría indicar que los esteroides sexuales estarían regulando negativamente la expresión de TSH en la hipófisis, mediante una posible modulación de la actividad mitogénica que ejerce la hormona sobre los tirocitos [307]. Los resultados obtenidos en los machos con peso normal, donde la expresión de TSH disminuye peripuberalmente, sin más cambios en el resto de días, lo que coincide con el aumento en la concentración de testosterona, estarían en consonancia con esa hipótesis. En las hembras con normopeso, en las que la concentración de estradiol aumentó a partir del periodo peripuberal, no se dieron diferencias significativas en la expresión de TSH durante el desarrollo, a pesar de lo cual, había una tendencia a disminuir.

2.1.1. Efecto del sobrepeso

En estados fisiológicos de sobrenutrición neonatal, como en el modelo animal llevado a cabo, el peso y longitud corporales en el periodo prepuberal aumentan respecto a las condiciones fisiológicas basales, siendo superiores en los machos a partir de la entrada en pubertad, y manteniéndose así en el adulto joven [47, 266]. El sobrepeso se considera como un factor potenciador de los procesos anteriormente descritos, asociados de manera normal con la edad, pudiendo, incluso, acelerar o alterar los cambios neuroendocrinos y metabólicos que suceden en las distintas etapas del desarrollo [271]. En esta situación fisiológica puede producirse un bloqueo de la acción periférica de la leptina – que de manera normal protege a los tejidos no adiposos de la acumulación de lípidos regulando la lipogénesis *de novo* – provocando de esta manera el incremento en la síntesis de ácidos grasos en los tejidos no adiposos, independientemente de la disponibilidad de los mismos [308], y además, impidiendo que los adipocitos puedan experimentar hiperplasia y almacenar correctamente el exceso de lípidos [309].

El incremento de peso, respecto al estado basal, durante el periodo prepuberal, se sabe que está relacionado con el aumento en los depósitos de grasa, principalmente subcutánea y visceral [47, 266], como así sucede en los dos tipos de grasa de ambos sexos en los días 10 y 21, correspondientes al periodo de tiempo en el que las ratas fueron sometidas a sobrenutrición; estando la grasa visceral asociada, en mayor grado que los depósitos centrales, con las patologías relacionadas con la obesidad [276].

En el día prepuberal 10, la cantidad de grasa subcutánea en las hembras fue superior a la de los machos, lo que puede estar relacionado, probablemente, con que las hembras hayan experimentado un ritmo más elevado que los machos en el incremento de los depósitos de grasa, los cuales, se ha demostrado que aumentan a mayor velocidad que el peso corporal [277], que en este punto temporal no presentaba diferencias sexuales. La

ganancia de peso desde el destete hasta el adulto joven presentó dimorfismo sexual (mayor peso en los machos) pero la ingesta total durante este periodo de tiempo en los animales con sobrepeso no fue superior a los controles en ninguno de los dos sexos. Al mismo tiempo, la cantidad relativa de grasa subcutánea y visceral no presentaba cambios en los animales con sobrepeso en relación a sus controles, en ningún punto experimental de este periodo temporal. Conjuntamente, estos datos apuntarían a la posibilidad de que la modificación en la etapa postnatal temprana de los mecanismos metabólicos y neuroendocrinos que controlan el equilibrio homeostático, podría determinar el desarrollo de sobrepeso y el mantenimiento del mismo en periodos temporales posteriores, sin cambios importantes en parámetros como los mencionados anteriormente [281].

Diferentes estudios han demostrado que durante la vida postnatal temprana de las ratas con sobrepeso se produce un incremento en la concentración de leptina y una prolongación en el tiempo del pico de la hormona, debido al incremento en la síntesis endógena de la hormona como consecuencia del aumento en los depósitos de grasa, y a la mayor ingesta de leptina proveniente de la leche materna [281, 310]. Este hecho se cree que está relacionado con una alteración en la génesis de determinadas rutas neuronales y la contribución al posterior incremento en la ganancia de peso corporal [281]. En la vida postnatal temprana (días 10 y 21) de los animales con sobrepeso estudiados, no hubo diferencias significativas en la concentración de leptina respecto a los animales con normopeso, así como tampoco entre sexos, debido a la variabilidad que existió. A pesar de lo cual, podía apreciarse una tendencia a incrementar en los animales con sobrepeso respecto a sus controles. Como se ha apuntado anteriormente, esto podría deberse al estrés originado por la manipulación de los animales [283], aunque también puede suceder que no todos los animales respondan de la misma forma a las manipulaciones por razones innatas.

En los días peripuberal 30 y postpuberal 50, la concentración de leptina en los animales con sobrepeso no fue mayor que la de sus controles, ni tampoco hubo diferencias sexuales, lo que se correlaciona con la cantidad relativa de grasa subcutánea, la cual tampoco fue mayor que la de los animales con peso normal, ni tampoco en ninguno de los dos sexos. En el adulto joven de día 85, la grasa subcutánea relativa fue mayor en los machos; sin embargo, la leptina circulante no fue significativamente superior en los machos debido a la variabilidad en las determinaciones de la hormona en los dos sexos [283], aunque sí se podía apreciar una tendencia en ese sentido.

En distintos trabajos de investigación en roedores y humanos, se ha evidenciado que la secreción de las hormonas del crecimiento y estimulante de la tiroides, así como la respuesta a sus acciones, se ve reducida en los individuos obesos [301, 311, 312]. Por ello,

se ha propuesto que la leptina podría tener importantes efectos inhibidores en la expresión y secreción de estas hormonas actuando en el hipotálamo y en la hipófisis [301, 313, 314]; ya que en estos estudios la concentración plasmática de la hormona adipocítica en los individuos obesos estaba incrementada. Con los datos obtenidos en el presente estudio no se podría apuntar en esa dirección, ya que no se hicieron mediciones de la concentración de esas dos hormonas para poder correlacionar con la expresión hipofisaria de las mismas, que en el caso de la hormona del crecimiento en los animales con sobrepeso de los dos sexos presentó mucha variabilidad, sin diferencias significativas con la expresión de la hormona en los animales con normopeso, a causa, probablemente, de la alteración que se produce en el patrón de expresión de esta hormona en estados de sobrepeso [311]. Además, la expresión de la hormona tiroidea en los machos y hembras con sobrepeso no mostró variaciones significativas respecto a los controles; excepto en el día postpuberal 50, en el que aumentó.

Por otro lado, se sabe que los animales con sobrepeso u obesidad desarrollan resistencia a la acción de la insulina, ya que en ese estado metabólico se requieren mayores niveles de la misma para tratar de mantener unos parámetros normales en la glucosa circulante [162]. Este proceso se considera la base fisiológica de todos los trastornos relacionados con la obesidad y tiene un especial interés en el periodo prepuberal [162, 286]. En relación con las modificaciones en los parámetros anteriores, se desarrolló mayor resistencia a la acción de la insulina en los animales con sobrepeso de los días postnatales 10 y 21, respecto a sus controles con peso normal; en el primero de los días en los machos y en el segundo de ellos en las hembras, con un índice de resistencia a la insulina superior en los machos con sobrepeso en el día 10. Con el avance de la edad, y en paralelo a la disminución peripuberal en la concentración de leptina y posterior incremento en el adulto joven, se puede comprobar que se pierde la resistencia insulínica respecto a los animales con peso normal, como así sucede en adultos jóvenes de edades similares [266].

Como se ha propuesto anteriormente, todos estos cambios morfológicos y hormonales, en su conjunto, sugieren que la alteración, en etapas tempranas de la vida postnatal, de los mecanismos metabólicos y neuroendocrinos que controlan el equilibrio homeostático, determina el desarrollo de sobrepeso y el mantenimiento del mismo en etapas posteriores de la vida [281].

2.2. Plasticidad neuroglial y pubertad

Al mismo tiempo que se producen una serie de importantes modificaciones en la composición corporal durante el desarrollo, tienen lugar, igualmente, una serie de procesos adaptativos en el sistema nervioso, de manera muy significativa en el periodo prepuberal, en los cuales las células que forman parte de él responden a diferentes estímulos, endógenos y exógenos, modificando sus características morfológicas y funcionales [315].

Vida postnatal y periodo prepuberal:

Las células gliales ejercen un importante papel en la regulación neuroendocrina y como mediadores de la diferenciación sexual que las hormonas gonadales inducen sobre diferentes áreas del cerebro en la vida intrauterina y postnatal [315]. Además, estas células expresan receptores para hormonas gonadales, pueden metabolizar esteroides sexuales y también participar en la síntesis de esteroides por parte del sistema nervioso [316]. El dimorfismo sexual en la diferenciación de la astrogliá tiene un efecto substancial en la organización de la red neuronal que regula la actividad y secreción de las neuronas GnRH, cuyo incremento sostenido en el tiempo es necesario para el comienzo de la pubertad [234, 235]. En diferentes estudios con roedores se ha comprobado que la exposición a testosterona en el feto resulta en modificaciones en el número y función de las señales sinápticas, además de diferencias en la morfología de las prolongaciones de las células gliales asociadas con las neuronas GnRH [317-319]. Durante el periodo prepuberal, las redes que regulan la actividad de las neuronas GnRH (neuronas GABAérgicas, preproencefalinérgicas, glutaminérgicas y neuronas kisspeptina) presentan modificaciones en su morfología y funcionamiento, que ocurren en paralelo con cambios en la morfología y bioquímica de los tanicitos de la eminencia media del hipotálamo, lo que permite regular la liberación de GnRH en los vasos sanguíneos de esta área [320-322].

El núcleo arcuato del hipotálamo, además de contener varias poblaciones neuronales implicadas en el control de las células GnRH, también integra señales hormonales como leptina, insulina, testosterona o estradiol, que pueden regular el balance energético y la ingesta, de la misma forma que la plasticidad sináptica en esta zona del hipotálamo, principalmente en el periodo prepuberal, coordinando la liberación de GnRH con los cambios fisiológicos relacionados con la composición corporal [281, 323, 324]. Se cree que la amplitud y el tiempo del pico fisiológico de leptina en la vida postnatal temprana, tendrían un rol muy importante en la formación de redes neuronales directamente relacionadas con el control del equilibrio homeostático [281]. Horvath y colaboradores han demostrado que la administración de leptina en roedores deficientes en la misma, regula el número de sinapsis excitatorias e inhibitorias y las corrientes postsinápticas en las neuronas NPY y POMC del núcleo arcuato

[325]. Además, se ha comprobado que esta hormona estimula la extensión de las neuritas en explantes de núcleo arcuato a partir del día 4 de vida postnatal [326].

Diferentes trabajos de investigación llevados a cabo en ratas, han revelado que la maduración paralela de las membranas neuronales y las células gliales, junto con la integración de las señales sinápticas durante el periodo prepuberal, origina una organización sexualmente dimórfica de las sinapsis neuronales y la glía, de tal modo que únicamente las hembras podrán responder en el periodo postpuberal a los efectos que el estradiol ejerce sobre la plasticidad sináptica, incidiendo en el dimorfismo sexual no sólo del sistema reproductor si no del crecimiento y de la composición corporal [327-329]. Estas diferencias sexuales se deben a la secreción perinatal de testosterona en las ratas macho, con el consiguiente incremento de la expresión en los astrocitos de la proteína citoesquelética que regula la morfología celular de la astrogliá: la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), y provocando la inactivación de los receptores de estrógenos [330]. Estos hechos inducen el crecimiento y ramificación de las prolongaciones astrocíticas y la extensión de las membranas neuronales recubiertas con estas prolongaciones [330]. Además de estos cambios en la morfología astrocitaria, también se produce una gran reducción en la densidad de las espinas dendríticas y las sinapsis axosomáticas en las neuronas del núcleo arcuato [331-333].

Durante la vida postnatal temprana, la hipófisis, que ya tiene capacidad funcional, puede responder a la secreción esporádica de GnRH, participando de esa manera en la organización de la función reproductora en ambos sexos [334]. En las ratas hembra se produce un pico de LH y FSH, que se cree está relacionado con el inicio del desarrollo folicular [335], desde el día postnatal 8-10 hasta, aproximadamente, el día 21 [336-338]. Durante este periodo de tiempo, sólo GnRH puede controlar la secreción de gonadotropinas [334], no siendo la hipófisis capaz de responder a los estímulos estrogénicos hasta este momento [339, 340], a partir del cual comienza a disminuir la expresión de estas hormonas [341], tal y como sucede en las hembras con peso normal. En los machos, las dos gonadotropinas, en especial FSH, están implicadas en el control de la diferenciación de las células de Leydig y Sertoli, y en el desarrollo de las células germinales desde etapas muy tempranas de la vida postnatal hasta la primera espermatogénesis, alrededor del día 40-45 [342], aumentando progresivamente su expresión, como así sucede en los machos con peso normal.

Periodo postpuberal y adulto joven:

En el periodo postpuberal de las ratas hembra, los cambios en la morfología de los astrocitos asociados con las neuronas GnRH del área preóptica rostral del hipotálamo, están relacionados con la liberación de gonadotropinas, las cuales presentan una ralentización en

su ritmo de producción y amplitud de los pulsos, que va en aumento conforme avanza el desarrollo [341, 343], como sucede en la expresión de LH y FSH en las hembras con peso normal de este trabajo. Este hecho se cree que podría estar relacionado con una disminución en la capacidad de respuesta al estradiol de las neuronas Kiss1 del núcleo periventricular anteroventral del hipotálamo [344], lo que explica el incremento de la hormona esteroide en la edad adulta. En los machos, los patrones decrecientes en la expresión de estas hormonas en el día 85, apuntarían a la posibilidad de una situación análoga a las hembras en este periodo del desarrollo, donde se sabe que la testosterona, la cual aumenta en la edad adulta [345], juega un importante papel en la plasticidad de las neuronas del área preóptica del núcleo arcuato, inhibiendo la liberación de GnRH y de las hormonas gonadotrópicas [346].

Durante el ciclo estral de las ratas, que puede durar entre 4 y 6 días, se ha comprobado que el área superficial y el número de prolongaciones por astrocito disminuyen desde la mañana del proestro – antes del incremento en la expresión de LH y FSH – hasta la tarde de esta fase, en paralelo con el incremento en la concentración plasmática de LH que se da en este momento. Al día siguiente, en estro, tanto el área superficial como el número de prolongaciones astrocitarias retorna a niveles similares a los de la mañana del proestro [347]. Los tanicitos también juegan un importante papel durante el ciclo estral, ya que sus prolongaciones se extienden y retraen siguiendo los cambios hormonales, regulando de esta forma la liberación de GnRH [315]. Durante la etapa preovulatoria, las prolongaciones de estas células se retraen, permitiendo el contacto de manera transitoria entre las prolongaciones de las neuronas GnRH y los vasos sanguíneos portales [348, 349].

Es importante destacar que no sólo la plasticidad neuroglial y neuronal está relacionada con la modulación de la liberación de GnRH, si no que se ha propuesto que la oscilación diurna en la inmunorreactividad de GFAP en el área peri-supraquiasmática podría tener un papel relevante en ese proceso, acoplado los ritmos circadianos al aumento de LH inducido por el estradiol [350]. Además, en este periodo del desarrollo, el núcleo arcuato también presenta plasticidad sináptica y remodelado glial, procesos que están muy relacionados con variaciones hormonales durante el ciclo ovárico [315]. El número de sinapsis axosomáticas en las neuronas GABAérgicas disminuye entre la mañana y la tarde del proestro, permaneciendo sin cambios hasta la mañana del estro, donde de nuevo incrementan hasta alcanzar las condiciones basales en la mañana del metaestro. Las sinapsis en las espinas dendríticas de las neuronas glutamatérgicas también experimentan un incremento importante en la tarde del proestro, permaneciendo sin cambios el día del estro y retornando a niveles basales en los siguientes dos días [329]. Todos estos cambios están asociados con el incremento que el estradiol induce en la activación neuronal en el núcleo

arcuato, controlando la secreción de GnRH y el incremento de gonadotropinas durante el ciclo ovárico [351, 352].

2.2.1. Efecto del sobrepeso

Los cambios descritos durante la vida postnatal, principalmente en la actividad neuronal del núcleo arcuato en respuesta a la modulación de la morfología astrocitaria, tienen un amplio impacto fisiológico, que puede ser alterado por determinadas condiciones metabólicas como la sobrenutrición neonatal [281, 352]. Así pues, el incremento y la tendencia a incrementar observados en las concentraciones de insulina y leptina, respectivamente, en los días 10 y 21 de los animales de ambos sexos sometidos a sobrenutrición durante este periodo de tiempo, podría estar alterando la correcta formación de las rutas neuronales que controlan el balance energético [281], y contribuyendo de esta manera, tal y como se comprobó, al incremento de peso respecto a los animales normonutridos. En los machos sobrenutridos, asimismo, el incremento en la concentración de testosterona respecto a los machos normonutridos, que se produjo en el día postnatal 10, contribuiría, aún más, al remodelado de neuronas y glía, especialmente a la reducción en las sinapsis de las neuronas del núcleo arcuato [331-333].

Además de los efectos que la sobrenutrición neonatal ejerce sobre el desarrollo de las redes neuronales que controlan el balance energético, también puede influir sobre las redes implicadas en el comienzo de la pubertad, con un potencial rol de la leptina en la formación de estas redes y en la activación de las mismas [232]. El Prof. Tena-Sempere y colaboradores han demostrado que la sobrenutrición en etapas tempranas de la vida postnatal de ratas, y el consiguiente desarrollo prepuberal de sobrepeso, provocan un avance en el comienzo de la pubertad, evidenciado más claramente en las hembras mediante el adelanto en la aparición de la apertura vaginal, relacionado con el incremento en la expresión del ARNm de Kiss1 y con el aumento en los niveles circulantes de las hormonas luteinizante y folículo estimulante [353, 354]. En los animales estudiados en el presente trabajo no se controlaron los signos externos indicadores de la entrada en pubertad; no obstante, en las hembras con sobrepeso, el aumento tendente en la concentración prepuberal de leptina y el incremento en la concentración peripuberal de estradiol, podrían ser compatibles con un posible adelanto en la entrada en pubertad. Asimismo, estas modificaciones en las redes que controlan la madurez sexual, pueden provocar en los animales adultos con sobrepeso fallos reproductivos, como consecuencia de anomalías en el ciclo estral o disminución de la motilidad espermática [355, 356].

Todas las modificaciones en la plasticidad de neuronas y neuroglía a consecuencia de la sobrenutrición en el periodo neonatal, y que contribuyen a una mayor ganancia de peso respecto a los animales normonutridos en esta etapa de la vida, podrían estar determinando, como se ha señalado anteriormente, el mantenimiento del sobrepeso en periodos más avanzados de la vida, además de alterar, posiblemente, el tiempo de entrada en pubertad [281]. En diferentes estudios de nuestro grupo se ha comprobado que en la rata adulta la sobrenutrición neonatal y la leptina tienen importantes efectos sobre las células gliales modificando su actividad, número y morfología [267, 357]. El papel que esta hormona podría ejercer sobre estas células en etapas más tempranas y su posible efecto en el comienzo de la pubertad deben de ser estudiados más profusamente.

2.3. Señalización por leptina en el hipotálamo

En el presente trabajo de investigación se evaluó la progresión evolutiva de STAT3 y SOCS3 en el hipotálamo de las ratas con nutrición normal, y los efectos que la sobrenutrición neonatal ejerce a lo largo del tiempo, para poder contrastar, de esta forma, el papel regulador de la señalización por leptina a lo largo de diferentes etapas de la vida postnatal de los animales con sobrepeso.

Fosforilación de STAT3 durante el desarrollo:

Este factor es una proteína de 92 KDa formada por 770 aminoácidos, con un dominio N-terminal en espiral, un dominio de unión al ADN, un dominio enlazador, un dominio SH2 y un dominio de activación C-terminal [358], el cual contiene un residuo de tirosina en la posición 705 y un residuo de serina en la posición 727, que cuando se activan por diferentes proteínas sufren una fosforilación [358]. La activación de STAT3 está regulada por la fosforilación de la tirosina 705 por parte de JAK-2 [181]. Esta fosforilación en el citoplasma provoca su dimerización, la translocación dentro del núcleo y la unión al ADN, regulando la transcripción de distintos genes, como se ha indicado en la parte introductoria de este trabajo [170, 172].

En la fosforilación de STAT3 en la serina 727 pueden estar implicadas distintas proteínas que inducen su inhibición o maximizan su actividad transcripcional, caso de la proteína quinasa C (delta) o mTOR, respectivamente [359-361]. Las proteínas ERK también pueden unirse a STAT3 y fosforilar la serina 727, en este caso provocando la regulación negativa de la fosforilación de la tirosina 705 [362]. Además de la fosforilación en la tirosina 705 y la serina 727 de la región C-terminal, STAT3 también puede ser acetilado por la histona acetil-transferasa p300 en el residuo de lisina 685 [363]. Esta acetilación de STAT3, que puede

ser reversible, es necesaria para formar dímeros estables, requeridos para la correcta unión al ADN y la regulación transcripcional [358].

En los machos normonutridos, los niveles hipotalámicos basales de fosforilación en la tirosina 705 de STAT3 siguen un patrón semejante a la leptina circulante, es decir, se mantienen sin cambios en el periodo prepuberal, disminuyendo peripuberalmente y con una tendencia a incrementar en las etapas posteriores. En cambio, la fosforilación de este factor en las hembras con nutrición normal, a pesar de que también disminuye en el día 21, se ve incrementada en el periodo peripuberal, y de nuevo disminuida posteriormente. Este incremento peripuberal en la fosforilación de STAT3 podría estar relacionado con el efecto permisivo que la leptina ejercería a nivel hipotalámico en el comienzo de la pubertad, posiblemente activando las redes neuronales implicadas en el incremento de la pulsatilidad de las neuronas GnRH [232]. La razón por la cual en los machos no se observa un incremento peripuberal en la fosforilación de STAT3, posiblemente se deba a que la entrada en pubertad se produce, aproximadamente, entre 5 y 8 días más tarde del día que se ha estudiado, momento en que sí podría aumentar la fosforilación de STAT3, hecho que se puede apreciar, de manera tendente, en el día postpuberal 50.

SOCS3 durante el desarrollo:

En casi todos los trabajos publicados hasta la actualidad en relación con el papel de esta proteína en el hipotálamo, se ha demostrado que la leptina estimula la expresión de SOCS3, proteína que directamente inhibe la señalización de la hormona impidiendo la fosforilación de JAK-2 o actuando directamente sobre STAT3 [183, 185]. También se ha observado que la inhibición de SOCS3 en las neuronas aumenta la sensibilidad a la leptina y, en último término, podría proteger contra la obesidad inducida por la dieta [364-366]. Además, se ha publicado que la expresión específica de STAT3 en el hipotálamo es suficiente para inducir resistencia a la leptina mediada por SOCS3 [367]. Este mecanismo sería análogo al que se da en la señalización de la insulina a través de su receptor, donde un tratamiento crónico con esta hormona resulta en la activación de rutas reguladoras negativas mediadas por SOCS3 o PTP1B, que actúan sobre el receptor de insulina o revirtiendo la fosforilación de IRS1 [191, 192]. Sin embargo, podría decirse que en estos trabajos el estudio de SOCS3 ha sido parcial, ya que se han utilizado, de manera general, individuos adultos que no presentaban obesidad, evaluando la acción de SOCS3 sólo en un sexo, o se han utilizado modelos experimentales alterados genéticamente, sin enfocar, en ningún caso, las investigaciones en el periodo prepuberal ni tampoco en un contexto evolutivo, valorando las posibles divergencias sexuales.

Diferentes trabajos con roedores han demostrado que en la etapa postnatal temprana, los niveles de SOCS3 en el hipotálamo mebiobasal aumentan a causa del pico fisiológico de leptina [368-370], lo que explica que los resultados del presente estudio relativos a la cantidad de SOCS3 en el día 10 sean los más elevados del periodo de tiempo estudiado. Se sabe que en esta etapa postnatal temprana la leptina no ejerce efectos metabólicos [371], lo que ha sido interpretado por algunos autores como una relativa falta de sensibilidad a esta hormona en el cerebro neonatal [372], quizá relacionado con unos niveles elevados de SOCS3. Otros autores, sin embargo, creen que la leptina neonatal ejercería funciones relacionadas con el desarrollo cerebral [371, 373].

En los siguientes puntos temporales la proteína SOCS3 decreció drásticamente, en paralelo con la disminución en la leptina circulante, con significación en el día prepuberal 21 y después de la entrada en pubertad (día 50). Paradójicamente, este patrón decreciente en los niveles de SOCS3 estuvo acompañado por un incremento en la ingesta y en la ganancia de peso corporal. Una observación relativamente similar se obtuvo en un trabajo del grupo de Adan y colaboradores [374] en el que utilizaron vectores virales para suprimir la expresión de SOCS3 en el hipotálamo mediobasal de ratas de 48-50 días, pudiendo comprobar que los animales seguían comiendo e incrementando su peso corporal de igual manera que los controles, con un aumento en la expresión de NPY en el núcleo arcuato. Estos resultados, junto con los obtenidos en este trabajo, sugieren que la modulación de SOCS3 en el hipotálamo podría depender de una determinada concentración de la hormona adipocítica, por debajo de la cual, el regulador negativo de la señalización por leptina disminuye. Por ello, sería plausible proponer que en edades postpuberales más avanzadas que las estudiadas en este trabajo, en las que se sabe que la concentración de leptina aumenta considerablemente respecto a etapas anteriores [375], y en las que también se producen cambios en la composición corporal, en las hormonas circulantes y en la plasticidad de neuronas y neuroglía [267, 287, 288], la proteína SOCS3 aumente sus niveles. Esta hipótesis se apoya en las observaciones hechas en diferentes estudios con ratas de 3, 6, 12 y 24 meses [370, 374, 375]. En ellos, las ratas adultas más avanzadas (6, 12 y 24 meses) presentaban más concentración de leptina y niveles superiores de SOCS3 en el hipotálamo mediobasal que las ratas de 3 meses (edad similar al último punto experimental estudiado en este trabajo), lo que se ha relacionado con la resistencia central a la acción de la leptina, y el consiguiente incremento en la ganancia de peso, que se desarrolla de manera fisiológica con el avance de la edad.

2.3.1. Efecto del sobrepeso

La fosforilación en la tirosina 705 de STAT3 y la proteína SOCS3 no cambiaron, respecto a los controles, en los machos con sobrepeso en ninguno de los puntos temporales, al mismo tiempo que la concentración de leptina tampoco fue significativamente superior a los controles. Esta observación sugiere que las alteraciones que se producen en la formación de las redes neuronales en la etapa neonatal, y que determinan el posterior incremento de peso respecto a los animales con normonutrición, dependerían de otra modificación en los mecanismos que rigen el balance energético, distinta a la alteración en la señalización intracelular por leptina; probablemente como consecuencia del incremento respecto a los machos normonutridos en la testosterona circulante en la vida postnatal temprana, con el consecuente agravamiento en la reducción de las sinapsis de las neuronas del núcleo arcuato, el incremento de la expresión de GFAP y la inactivación de los receptores de estrógenos, induciendo de esta forma el crecimiento y ramificación de las prolongaciones astrocíticas y la extensión de las membranas neuronales recubiertas con estas prolongaciones [330-333].

En las hembras con sobrepeso la fosforilación de STAT3 disminuyó, respecto a las hembras con peso normal, en el día 10, al mismo tiempo que existió una tendencia a incrementar en la proteína SOCS3 y en la concentración de leptina. Estos datos podrían significar que la señalización por leptina en la neuroglía y en las neuronas hipotalámicas estaría alterada en esta etapa neonatal, con la consecuente modificación funcional en las redes neuronales responsables del equilibrio homeostático [281, 352]. Esta posible eventualidad, unido con el incremento de SOCS3, respecto a las hembras con peso normal, tanto prepuberal (sin cambios pero tendencia a incrementar en la concentración de leptina) como postpuberalmente (sin cambios en la concentración de leptina), podrían contribuir al desarrollo y mantenimiento del sobrepeso. En estudios posteriores será muy importante clarificar en qué células se están produciendo esos cambios como consecuencia del sobrepeso, si esas células son las mismas o no a lo largo del desarrollo y en qué funciones estarían implicadas durante las diferentes etapas de la vida postnatal, prestando un especial interés al comienzo de la pubertad. En análisis preliminares de la posible expresión de SOCS3 en neuronas kisspeptina, no se han dado resultados positivos de colocalización; sin embargo, es necesario seguir investigando al respecto.

Un resultado interesante en las hembras con sobrepeso es el referido a la fosforilación de STAT3 en el día 30 (sin cambios en la concentración de leptina). En este punto la fosforilación fue menor que la de las hembras con peso normal. Sin embargo, en estas ratas los niveles de fosforilación no disminuyeron respecto a la etapa postnatal temprana, lo que sugiere que la leptina podría estar actuando de manera continua en el hipotálamo durante

todo el desarrollo prepuberal de estas ratas, independientemente de la concentración circulante de la hormona, provocando una reestructuración de las redes neuronales que no sólo implique la alteración del equilibrio homeostático, si no también la activación temprana de las neuronas GnRH, como así se ha demostrado en ratas hembra con sobrepeso [353, 354].

Este dimorfismo sexual en la señalización basal por leptina en el hipotálamo, como consecuencia de la sobrenutrición neonatal y el consiguiente desarrollo de sobrepeso, podría afectar a la respuesta ante determinados estímulos en etapas tan importantes como el comienzo de la pubertad. Por esta razón, se estudió a continuación la sensibilidad central a un incremento agudo de leptina, la cual se considera un factor permisivo en el comienzo de la pubertad [204].

3. Respuesta a la administración aguda de leptina

La acción aguda de la leptina en estados fisiológicos de sobrepeso u obesidad, y la respuesta central que podría inducir, está muy poco estudiada, menos aún en la etapa prepuberal del desarrollo. Por ello, en este trabajo se estudió la señalización intracelular en el hipotálamo de animales prepuberales de ambos sexos (día 21), y la señalización intracelular y expresión génica en el hipotálamo e hipófisis de animales peripuberales de los dos sexos: día 30 en las hembras y día 35 en los machos. Los tiempos de estudio de la respuesta a la leptina, 45 minutos y 2 horas después de la inyección intraperitoneal, se determinaron en función de la farmacocinética de la hormona, la cual se produce de manera endógena en las ratas en dos modos: un denominado “pool inicial rápido” con una vida media de la hormona de 3,4 minutos y un “pool lento” con una vida media de 71 minutos y una tasa de aclaramiento global de 6,16 mL/min/Kg [376]. La leptina recombinante que se administra exógenamente tiene una vida media de 90 minutos [377] y puede inducir cambios en el hipotálamo en los mismos tiempos o similares que los indicados anteriormente [257, 378].

El estudio de la acción y señalización de la leptina a través de su receptor se determinó principalmente mediante la detección de la fosforilación del factor de transcripción STAT3 en respuesta a la administración de la hormona. La determinación de los niveles de STAT3 fosforilado es la prueba de referencia para este tipo de estudios [379], ya que esta proteína se fosforila de manera rápida y directa por la acción del receptor de leptina, con lo cual la mayoría de STAT3 fosforilado en el hipotálamo se puede atribuir a la acción estimuladora de la hormona administrada [380, 381]. Además, se estudiaron proteínas clave en la rutas mediadas por PI3K/Akt y ERKs, encargadas de incrementar la sensibilidad a la leptina, promover la disminución de la adiposidad, activar la ruta de mTOR implicada en el

comienzo de la pubertad, estimular la proliferación celular y la transcripción de genes involucrados en la activación neuronal [210, 382, 383]. Asimismo, se evaluaron los reguladores negativos de la señalización por leptina más importantes: SOCS3 y PTP1B, que actúan sobre JAK-2 o STAT3 [183, 185], y PTEN, el cual actúa sobre PI3K [190].

3.1. Etapa prepuberal: señalización en el hipotálamo

En los animales control, los cuales no presentaban dimorfismo sexual en el peso corporal, longitud, grasas ni tampoco en la leptina circulante, el incremento en la concentración circulante de esta hormona después de 45 minutos de su administración fue superior en los machos. La respuesta central fue similar en ambos sexos: la fosforilación en la tirosina 705 de STAT3 se vio incrementada. En este momento no se observaron cambios en las proteínas de señalización y en los reguladores negativos estudiados, a excepción de la fosforilación de Akt en los machos, la cual estaba disminuida. Estos datos sugieren que las rutas de señalización por leptina pueden haberse activado y desactivado en periodos temporales más cortos que el estudiado, probablemente la ruta PI3K/Akt, a través de la cual se incrementa la sensibilidad a la hormona en respuesta a un incremento de ésta [382]. En los machos, donde la concentración de leptina era superior en este intervalo de 45 minutos, el tiempo de desactivación requerido podría ser mayor, de ahí que se haya detectado una disminución en su fosforilación en este momento.

Asimismo, el tratamiento con leptina en los machos control indujo un aumento, respecto a los niveles basales, en la concentración de testosterona, probablemente por la acción directa de la hormona administrada sobre sus receptores presentes en los testículos, lo que se ha demostrado *in vitro* en cultivos de testículos inmaduros de carnero [384].

3.1.1. Efecto del sobrepeso

Como se ha descrito anteriormente, la sobrenutrición neonatal provoca un incremento en el peso y longitud corporales en los dos sexos [47, 266], en los animales de este caso, relacionado con una mayor cantidad de grasa parda y subcutánea respecto a los animales control, sin dimorfismo sexual en ningún caso. Además, tanto en los machos como en las hembras con sobrenutrición, la grasa visceral perigonadal fue mayor que en los animales control, probablemente porque los adipocitos tuvieran un mayor perímetro a causa de un almacenamiento de lípidos superior a los animales control [266]. Solamente en las hembras con sobrepeso las gónadas fueron mayores que sus controles, probablemente por la aceleración del desarrollo folicular que se ha comprobado que sucede en estados de sobrepeso [385]. Asimismo, no hubo cambios en la concentración circulante de leptina

respecto a los niveles basales de los animales control, aunque existió más variabilidad interindividual que en estos últimos. Este hecho podría deberse al estrés inherente originado por la manipulación de los animales [283], especialmente en un momento tan crítico como el día prepuberal 21 en el que se destetaron los animales, momento que se ha demostrado que puede provocar cambios o variaciones en las concentraciones hormonales [386]. Obviamente, también puede suceder que no todos los animales, por razones innatas, respondieran de la misma forma a las manipulaciones.

En estos animales con sobrepeso, los niveles basales en la fosforilación en la tirosina 705 de STAT3 eran inferiores, en los dos sexos, respecto a los niveles basales en los animales control, lo que puede estar relacionado con una alteración en la señalización por leptina, que se sabe que sucede en los animales obesos, y que favorece la ganancia de peso [387]. El mecanismo molecular que provocaría esa alteración podría ser diferente en machos y hembras, ya que en los machos con sobrepeso los niveles basales de PTEN fosforilado, que actúa inhibiendo a PI3K, eran superiores a los niveles basales en los machos control. En las hembras con sobrepeso no había cambios en este regulador negativo; sin embargo, la fosforilación basal de Akt era inferior y los niveles de PTP1B, que actúa sobre STAT3, superiores a los niveles basales de las hembras control. Esta posible inhibición sexualmente dimórfica de la ruta mediada por PI3K/Akt podría conducir a una disminución en la sensibilidad a la leptina, promoviendo el incremento de peso [382]. No obstante, hay que considerar la posibilidad de que este dimorfismo sexual esté relacionado con la respuesta de distintos tipos celulares, ya que, como se ha reseñado en el punto 2.2., existen diferencias en machos y hembras en cuanto al desarrollo y maduración de las poblaciones de neuronas y glía en el hipotálamo [327-329]. Para comprobar esta hipótesis, debemos desarrollar estudios más precisos en este sentido, tratando de clarificar qué células podrían tener alterada la señalización por leptina en cada uno de los sexos.

La elevación en los niveles circulantes de leptina después de la administración aguda de la hormona en los animales con sobrepeso no fue diferente en machos y hembras, seguramente debido a la variabilidad interindividual en ambos, ni tampoco fue diferente respecto a los animales control tratados con leptina. Sin embargo, la respuesta en estos animales con sobrepeso fue diferente a la de los animales control con peso normal. El aumento en la leptina circulante de machos y hembras con sobrepeso provocó una respuesta relativamente semejante en los dos sexos: el aumento en la fosforilación en la tirosina 705 de STAT3, así como en la fosforilación de Akt, respecto a los niveles basales. Además, en los machos disminuyó la fosforilación del regulador negativo PTEN, sin cambios en las hembras, pero con mayor variabilidad interindividual que en el estado basal. Estas observaciones indicarían que los animales con sobrepeso serían más sensibles a la administración aguda de

leptina, activándose, probablemente, la ruta mediada por PI3K/Akt en las neuronas POMC, como así se ha comprobado en diferentes estudios [257, 378, 382].

En los machos con sobrepeso, cuyos niveles basales de testosterona eran superiores a los niveles basales de los machos control, se dio una respuesta de disminución en la testosterona circulante como consecuencia del incremento agudo en la concentración de leptina. Este hecho ha sido demostrado *in vitro* en testículos de roedores adultos con peso normal, pero no en individuos prepuberales [384, 388]. Estos datos sugieren que el tratamiento agudo con leptina en los machos con sobrepeso, en esta etapa del desarrollo, podría provocar una inhibición en la secreción de testosterona [388] o en la esteroidogénesis testicular, en este caso, probablemente, disminuyendo la expresión de distintos factores implicados en la ruta de producción de esteroides [389]. De cualquier modo, es necesario aclarar qué está sucediendo en los testículos de estos animales mediante el estudio de los mismos.

Todos los datos obtenidos en esta etapa prepuberl tras la administración de leptina, indican que la sobrenutrición neonatal, y los consiguientes cambios metabólicos y neuroendocrinos que induce, modificarían la respuesta a esta hormona en relación con los individuos control.

3.2. Etapa peripuberal

3.2.1. Señalización en el hipotálamo y activación del eje reproductivo

Como se ha descrito en la parte introductoria de este trabajo, el núcleo premamilar ventral del hipotálamo podría tener un papel muy importante en la mediación de los efectos de la leptina en el inicio de la pubertad [232, 239]. Esto es así, debido a que este núcleo contiene gran cantidad de neuronas que expresan receptores de leptina y que se proyectan directamente a neuronas GnRH [241, 252]. Asimismo, se ha demostrado en ratas y ratones adultos de ambos sexos que para que la leptina pueda ejercer efectos agudos en las neuronas del núcleo premamilar ventral, se requiere la activación de la ruta de señalización mediada por PI3K/Akt [257, 378, 390].

A) Hembras

En las hembras control, el incremento en los niveles circulantes de leptina, respecto a los niveles basales, después de 45 minutos de su administración provocó un incremento en la fosforilación en la tirosina 705 de STAT3, al mismo tiempo que una disminución de las dos isoformas de PTP1B respecto al estado basal, lo que podría implicar una disminución en la

desfosforilación de JAK-2 [185], contribuyendo, por tanto, al incremento que se observa en la fosforilación de STAT3.

A las 2 horas de la administración aguda de leptina, los niveles circulantes disminuyeron respecto al periodo temporal anterior, debido a la vida media de 90 minutos de la hormona recombinante administrada [377]. El aumento en la fosforilación en la tirosina 705 de STAT3, cuyos niveles en este momento seguían siendo superiores a los basales, podría estar relacionado con que la expresión de POMC fuera mayor, al mismo tiempo que la de NPY era menor que las hembras control tratadas con vehículo, como se ha demostrado en otros estudios [261, 378]. En ellos, la disminución en la expresión de NPY como consecuencia de la administración de leptina, va siempre acompañada de la disminución en la expresión de AgRP, aunque en periodos de tiempo superiores a los analizados en el presente trabajo, donde no ha sucedido lo mismo debido a la variabilidad interindividual, a pesar de lo cual se podía apreciar una tendencia a disminuir, que seguramente, en periodos de tiempo superiores podría ser significativa.

En este punto temporal, igualmente, se estaba produciendo una respuesta inhibitoria de la señalización por leptina en las rutas mediadas por PI3K/Akt y ERKs, ya que el regulador negativo SOCS3 había aumentado y la fosforilación de Akt y ERK-2 disminuido respecto al estado basal, lo que no sólo conduciría a una disminución en la transcripción de genes involucrados en la activación neuronal [185, 382, 383], si no que también podría implicar una falta de activación en la ruta de mTOR, lo cual, posiblemente, explicaría que los mecanismos de comienzo de la pubertad no se activen [210]. Ciertamente, esta hipótesis podría ser así, ya que no se produce ningún cambio en la expresión de la kisspeptina y de su receptor, como tampoco sucede en la expresión de GnRH, donde sí existía una tendencia a incrementar, pero que probablemente no refleje ningún tipo de activación de estas neuronas por leptina, ya que la expresión de las hormonas hipofisarias estudiadas, directamente controladas por GnRH, no presentó cambios; como tampoco hubo cambios en las concentraciones circulantes de LH y estradiol. Para demostrar esta hipótesis, se debería estudiar si la modulación que el incremento de leptina produce sobre la señalización de la misma en el hipotálamo, está relacionada con la expresión de SOCS3 en las neuronas GnRH y kisspeptina.

A.1) Efecto del sobrepeso

La sobrenutrición neonatal resultó en un incremento peripuberal del peso y longitud corporales, así como un incremento en la ingesta después del destete, en relación con las hembras control, como así se ha demostrado en distintos estudios [47]. Los depósitos de grasa no mostraron cambios relacionados con la sobrenutrición en este momento, de igual manera que sucedió en los animales del otro modelo experimental en esta misma etapa,

probablemente porque los depósitos de grasa sean mínimos en relación con el peso corporal – respecto a etapas anteriores o posteriores – en la entrada en pubertad [277].

A los 45 minutos, la concentración basal de leptina era mayor en las hembras con sobrepeso respecto a las ratas control, lo que se traducía en un incremento en la fosforilación en la serina 727 de STAT3 y en una disminución en los niveles de las dos isoformas de PTP1B y en la fosforilación de PTEN, respecto al estado basal de las hembras control. La fosforilación basal en la tirosina 705 no se detectó con la técnica de Western blotting en los controles ni en las ratas con sobrepeso, debido a que el tiempo de exposición para el revelado de las membranas no debía alargarse para detectar estas bandas de proteína, porque si fuera así, las bandas de las ratas tratadas con leptina estarían muy sobreexpuestas [391]. A las 2 horas, sí se detectó esta fosforilación, que no cambiaba en las hembras con sobrepeso respecto a los niveles basales de las hembras control. En este caso, se pudo exponer más tiempo las bandas de proteína porque la concentración de leptina en las ratas tratadas con esta hormona disminuyó respecto al anterior periodo temporal, lo que probablemente llevaba implícito una disminución en la fosforilación de STAT3. En este momento, no se observaron los cambios que se veían a los 45 minutos en la fosforilación en la serina 727 de STAT3, en PTP1B y en la fosforilación de PTEN, a causa de la variabilidad interindividual; sin embargo, se apreciaba una tendencia similar al anterior periodo temporal. Esta aparente normalización en los cambios que se observaban a los 45 minutos en los niveles basales de las ratas con sobrepeso, podría deberse, posiblemente, a la vida media de la hormona, la cual se produce de manera pulsátil en el organismo, y que es de 71 minutos [376], aproximadamente el tiempo transcurrido entre los dos puntos temporales.

En este momento, la expresión basal de NPY en las hembras con sobrepeso era superior a la expresión del neuropéptido en las hembras control, en consonancia con el incremento en la ingesta observado en esas ratas respecto a los controles. Al mismo tiempo, la expresión basal de POMC en esas ratas con sobrepeso no presentaba cambios respecto a los controles, por lo que el incremento observado en la fosforilación de STAT3 podría tener más relación con la activación de las neuronas NPY.

El incremento de leptina a los 45 minutos de la administración aguda de la hormona indujo una respuesta distinta en las hembras con sobrepeso respecto a los controles con el mismo tratamiento. En el hipotálamo de las ratas con sobrepeso se produjo un incremento en la fosforilación en la tirosina 705 de STAT3 y en la fosforilación de ERK-2 respecto a los niveles basales de estas ratas, por lo que se estaría estimulando la actividad neuronal, probablemente de las neuronas POMC [383].

A las 2 horas del tratamiento con leptina, con sus niveles circulantes disminuidos respecto al periodo temporal anterior, también se produjo una respuesta diferente en las hembras con sobrepeso respecto a las hembras control con el mismo tratamiento, que sugiere que las ratas con sobrepeso serían más sensibles a la leptina. En estas ratas, la fosforilación en la tirosina 705 de STAT3 seguía siendo superior a los niveles basales, siendo, incluso, mayor que en las hembras control con el mismo tratamiento. En este momento, la fosforilación de ERK-2 y la isoforma de membrana de PTP1B estaban disminuidas, al mismo tiempo que SOCS3 incrementado, respecto a los niveles basales de estas hembras con sobrepeso. Estos datos indican que la actividad neuronal en este momento, como consecuencia de la mayor cantidad de leptina disponible, estaría incrementada, probablemente en las neuronas NPY, donde la expresión del neuropéptido disminuye respecto a los niveles basales, con una tendencia a disminuir también en la expresión de AgRP. Al mismo tiempo, se estaba produciendo un incremento en la expresión de POMC, superior tanto a los niveles basales de estas hembras como a los niveles de las hembras control con el mismo tratamiento.

El incremento en la expresión del receptor de leptina, respecto a los niveles basales, que se producía en este momento, seguramente estaba relacionado con la acción que la leptina estaría ejerciendo en las neuronas POMC y NPY. No obstante, y a pesar de no observar cambios en la expresión de las proteínas y hormonas relacionadas con la pubertad, no es descartable que la leptina también pudiera estar ejerciendo su acción en otras neuronas hipotalámicas o en la glía [267, 357], induciendo modificaciones en esas células que harían que se activara el eje hipotálamo-hipófisis. Por ello, es necesario desarrollar nuevos modelos animales en los que se estudien los efectos en diferentes poblaciones neuronales, especialmente en células kisspeptina y GnRH, de un incremento agudo de leptina en tiempos más dilatados.

La elevación observada en la cantidad de proteína SOCS3 en respuesta al aumento en la concentración circulante de leptina, tanto en las hembras con sobrepeso como en los controles, podría indicar que las células hipotalámicas de las hembras peripuberales serían más sensibles a un aumento en la leptina circulante que las células del hipotálamo de las hembras prepuberales, probablemente por estar en un periodo de la vida postnatal más cercano al comienzo de la pubertad, momento en el cual la leptina ejercería importantes efectos [204]. Por otro lado, el dato referente al incremento de SOCS3 en respuesta a un aumento de leptina, podría ser acorde con la hipótesis propuesta en el punto 2.3, en la que se sugiere que la regulación de este inhibidor negativo de la señalización intracelular por leptina, dependería de un determinado incremento en la concentración de ésta. Sin embargo, para

poder probar esta hipótesis se debe estudiar la respuesta hipotalámica frente a distintas concentraciones de leptina.

Un resultado llamativo después de la administración de leptina en las hembras de la etapa peripuberal, así como en los animales prepuberales, es la ausencia de cambios que se observa en la fosforilación de JAK-2, en aparente discordancia con los cambios que se dan en la fosforilación de STAT3. En relación con ello, es importante mencionar el trabajo de Jiang y colaboradores en el que demostraron que la leptina puede estimular la fosforilación de STAT3 y la activación de la ruta mediada por ERKs en cultivos de neuronas humanas y de ratón deficientes en JAK-2 [392]. También comprobaron que los miembros de la familia de las tirosina quinasas Src estarían implicados en la señalización de la leptina independientemente de JAK-2. Además, observaron que la sobreexpresión de JAK-2 en esos cultivos neuronales aumentaba la señalización por leptina, sugiriendo que JAK-2 podría funcionar como una tirosina quinasa y como un adaptador para la transducción de la señal de esta hormona. Asimismo, sugirieron que las rutas dependiente e independiente de JAK-2 podrían actuar de manera sinérgica para mediar las respuestas a la leptina. Estos interesantes hallazgos de Jiang y colaboradores, junto con la ausencia de cambios en la fosforilación de JAK-2 en respuesta al incremento de leptina en los animales del presente trabajo, requiere que se contraste el papel de JAK-2 en la señalización por leptina utilizando animales modificados genéticamente para que sean deficientes en esta tirosina quinasa.

B) Machos

En los machos control, el incremento en la leptina circulante después de 45 minutos del tratamiento agudo con la hormona, indujo únicamente un incremento en la fosforilación en la tirosina 705 de STAT3 respecto al estado basal. A las 2 horas, con una tendencia a disminuir en la leptina circulante, se mantuvo el incremento en la fosforilación en la tirosina 705 de STAT3 en relación con los niveles basales, pero no hubo ningún cambio en las proteínas de señalización y en los reguladores negativos de la ruta intracelular de la leptina; lo que explica que tampoco hubiera ningún efecto sobre la expresión de los neuropéptidos relacionados con la regulación de la ingesta, y las proteínas y hormonas implicadas en las rutas de activación del eje hipotálamo-hipófisis. Estos datos sugieren que los machos control no serían tan sensibles como las hembras en la etapa previa al comienzo de la pubertad.

B.1) Efecto del sobrepeso

La sobrenutrición neonatal conllevó un incremento peripuberal en el peso y longitud corporales, como se ha descrito anteriormente [47], acompañado por un aumento en la grasa visceral perigonadal, del mismo modo que un aumento en la ingesta después del destete en

los machos con sobrepeso en relación con los controles, que no mostró cambios en el día peripuberal 35.

A los 45 minutos, la concentración basal de leptina era mayor en los machos con sobrepeso respecto a los animales control, lo cual se reflejaba en el hipotálamo en una respuesta distinta a la que se daba en los animales control. En los machos con sobrepeso se produjo un incremento en la fosforilación de JAK-2 y una disminución en la fosforilación de Akt respecto a los niveles basales de los machos control. Los niveles basales en la fosforilación en la tirosina 705 de STAT3 no se detectaron con la técnica de Western blotting a causa de la misma problemática reseñada anteriormente. A las 2 horas, donde la concentración circulante de leptina no mostraba cambios significativos respecto al anterior tiempo, pero se apreciaba una clara tendencia a disminuir, sí se detectó la fosforilación basal en la tirosina 705 de STAT3 porque se pudo exponer más tiempo las bandas de proteína, comprobando que los niveles basales de los machos con sobrepeso no cambiaban respecto a los niveles basales de los machos control.

A pesar del incremento en la fosforilación de STAT3, la expresión basal de NPY no presentó cambios en los machos con sobrepeso respecto a los controles, lo que explica que en este momento no hubiera diferencias significativas en la ingesta. Tampoco hubo una respuesta diferencial en la expresión de POMC y de las proteínas y hormonas relacionadas con la activación del eje hipotálamo-hipófisis. Por lo tanto, ese aumento en la fosforilación de STAT3 podría estar relacionado con la modulación de otros tipos celulares en el hipotálamo, como se apuntó anteriormente que podría suceder en las hembras con sobrepeso [267, 357].

En los machos con sobrepeso, el incremento de leptina después del tratamiento indujo una respuesta central diferencial respecto a los machos control, que sugiere que los machos con sobrepeso serían más sensibles al incremento agudo de leptina. A los 45 minutos, en el hipotálamo de los animales con sobrepeso se produjo un incremento en la fosforilación en la tirosina 705 de STAT3 respecto al estado basal. A las 2 horas, sin cambios significativos en la leptina circulante, se mantuvo la misma respuesta que en el tiempo anterior, y además aumentó la fosforilación de JAK-2. A pesar de ello, no hubo cambios en el resto de proteínas e inhibidores de la ruta de señalización por leptina, ni tampoco se produjo ningún cambio en la expresión de los neuropéptidos y factores relacionados con el eje reproductivo, lo cual no quiere decir que en tiempos más largos pueda ser así, posibilidad que deberá comprobarse estudiando la respuesta a la administración aguda de leptina en periodos de tiempo más dilatados.

Asimismo, a las 2 horas del tratamiento con leptina, en los machos con sobrepeso la concentración circulante de LH era superior al estado basal y a la de los machos control con el mismo tratamiento. Este dato sugiere que la leptina podría estar activando a las células de la adenohipófisis, donde se sabe que existen receptores para esta hormona [301]. Mediante cultivos celulares de hipófisis de ratas macho adultas, se ha comprobado que, efectivamente, la administración de leptina induce el incremento de la concentración de la hormona luteinizante [393]. La disminución en la expresión hipofisaria de LH, que también se observó en este momento, podría deberse a la activación de un mecanismo de retroalimentación negativa en respuesta a los elevados niveles circulantes de esta hormona, como sucede en cultivos celulares de hipófisis de ratas hembra adultas, en los que la administración de leptina a dosis elevadas disminuye la concentración de esta gonadotropina [394].

3.2.2. Factor neurotrófico derivado del cerebro: posible papel en la obesidad y en la pubertad a través de la leptina

Un mecanismo importante que se cree que podría estar implicado en el desarrollo de la obesidad y en el comienzo de la pubertad, es el relacionado con los factores de crecimiento de la familia de las neurotrofinas: el factor neurotrófico ciliar y, en especial, el BDNF. Se cree que estas moléculas tienen la capacidad de modular la remodelación sináptica e influir en la interacción entre las neuronas sensibles a la leptina, en respuesta a determinados factores genéticos y/o medioambientales [395, 396]. El factor neurotrófico ciliar tiene la capacidad de inducir la pérdida de peso en ratones adultos obesos mediante el estímulo de la neurogénesis hipotalámica. Cuando ésta se inhibe farmacológicamente, se bloquean los efectos anorexigénicos que a largo plazo posee este factor [395].

El BDNF es una neurotrofina con capacidad de promover la supervivencia neuronal, la diferenciación y la plasticidad sináptica [396], y está directamente implicada en el control de la homeostasis energética por parte del sistema nervioso central [397, 398]. En los humanos, los polimorfismos genéticos relacionados con BDNF están asociados con el desarrollo de obesidad [88, 399, 400]. Del mismo modo, los ratones con alteraciones en la expresión de BDNF presentan hiperfagia y desarrollan obesidad [401, 402]. Los efectos que BDNF ejerce en la regulación de la ingesta y el peso corporal se atribuyen a la activación que este factor induce en el receptor TrkB [402, 403]. Existe una gran cantidad de neuronas que expresan este receptor, sobre todo en los núcleos paraventricular y ventromedial del hipotálamo, y en el complejo dorsal vagal del rombencéfalo, conformado por el área postrema, el núcleo del tracto solitario y el núcleo dorsal motor del nervio vago [397, 404, 405]. A pesar de la expresión ubicua de BDNF, los diferentes estudios al respecto intentan identificar cuáles son las neuronas capaces de mediar el papel de la neurotrofina en la homeostasis energética,

centrándose, sobre todo, en el hipotálamo y el núcleo del tracto solitario [404-406]. Estas investigaciones sugieren que la señalización por BDNF a través del receptor TrkB puede influir en la regulación del balance energético al actuar éste como un inductor de rutas potenciadoras de los efectos catabólicos de la leptina. En relación con ello, se ha comprobado que las alteraciones en el balance energético que se dan en los animales obesos con deficiencia en el receptor de leptina, pueden ser revertidas tras inyecciones periféricas repetidas de BDNF o mediante la activación del receptor TrkB [407, 408]. Esta neurotrofina, además, se ha relacionado con la neurogénesis que se produce en determinadas zonas del cerebro en la pubertad [409-411], y se ha comprobado que el incremento en la expresión de las neuronas kisspeptina del hipocampo modula positivamente la expresión de BDNF [412], aunque aún permanece por dilucidar si en el hipotálamo puede suceder lo mismo.

A) Hembras

En las hembras con sobrepeso, la expresión basal hipotalámica de BDNF era menor que la expresión basal en las hembras control, lo que sugiere que en estas ratas no se daría un posible efecto potenciador de esta neurotrofina sobre la señalización de la leptina a través del receptor TrkB en condiciones basales.

Sin embargo, las hembras con sobrepeso mostraron un incremento en la expresión de BDNF después de la administración de leptina, que en el caso de las hembras control no fue significativo. Este efecto de la hormona sobre BDNF podría estar relacionado con la semejanza de las rutas de señalización intracelular a través del receptor de leptina y de TrkB, aumentando la sensibilidad a la leptina. La presencia del complejo Shc-Grb2-Sos en la cara interna del receptor, el cual está implicado en la activación de la ruta de ERK1/2, es común en ambos casos [181, 413]. Además, el receptor TrkB también es capaz de regular la cascada de señalización mediada por PI3K-Akt-mTOR [181, 413]. El trabajo de Liao y colaboradores [88] también apunta en esta dirección, ya que demostraron que la inyección intraperitoneal de leptina en ratones activaba la expresión de BDNF en el hipotálamo, concretamente en los núcleos dorsomedial y ventromedial. En ese trabajo, además, comprobaron que las regiones 3' no traducidas del ARNm de la neurotrofina presente en las dendritas, y las cuales están relacionadas con la regulación de la expresión génica, son esenciales para el mantenimiento del equilibrio homeostático y la respuesta a la leptina.

B) Machos

La expresión basal de BDNF en el hipotálamo de los machos no presentó cambios debidos al sobrepeso ni a la administración de leptina. Este resultado es concordante con la ausencia de efectos en la inducción de la expresión génica de los neuropéptidos implicados en el control de la ingesta, así como en los factores implicados en la pubertad. No obstante,

en este momento puede ocurrir que la leptina sí esté promoviendo la expresión de BDNF, pero en otra zona del cerebro. Bariohay y colaboradores [404] observaron que tras la administración periférica de leptina en ratas macho adultas, el contenido proteico de BDNF incrementaba en el complejo vagal dorsal pero no en el hipotálamo. Asimismo, observaron que en las ratas adultas que presentan hiperleptinemia, se produce un aumento de la expresión de la neurotrofina en el complejo vagal dorsal pero, al igual que en el caso anterior, este hecho no se produce en el hipotálamo [414].

Los resultados sexualmente dimórficos en respuesta a la administración aguda de leptina en los periodos temporales estudiados en este trabajo, así como los distintos valores en machos y hembras peripuberales en las concentraciones circulantes de leptina después del tratamiento con la hormona, los cuales eran similares en el estado basal de los dos grupos (sobrepeso y control), pero después del tratamiento con leptina eran 9 y 2 veces superiores en los machos, y alrededor de 130 y 36 veces superiores en las hembras respecto al estado basal de las ratas control y con sobrepeso, respectivamente; sugieren que las hembras son más sensibles a esta hormona cerca de la entrada en pubertad, con una alteración de la respuesta central como resultado del sobrepeso, que probablemente influiría en un avance en el comienzo de la pubertad, tal y como se ha demostrado en los estudios del Prof. Tena-Sempere y colaboradores [353, 354].

4. Consideraciones finales

La pubertad es un proceso fisiológico complejo que se inicia a causa de un incremento en la pulsatilidad de las neuronas GnRH, con el subsiguiente aumento en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. El conocimiento sobre las señales neurohormonales y los mecanismos responsables de la inducción del incremento en la frecuencia pulsátil de estas neuronas es incompleto. A pesar de ello, está bien establecido que el balance y la interacción entre las señales metabólicas y la fase de desarrollo son muy importantes para el control del comienzo de la pubertad y la correcta maduración sexual. La obesidad, cuyo desarrollo en etapas infantojuveniles está asociado con una mayor persistencia de la misma en la edad adulta, se ha asociado con el adelanto en el comienzo de la pubertad, especialmente en niñas. El posible papel que la leptina ejercería en el adelanto de la pubertad en los individuos obesos, y las rutas o mecanismos implicados en este proceso, son aún inciertos. Consecuentemente, para tratar de comprender mejor el funcionamiento y el posible efecto permisivo de la hormona en este proceso, se ha llevado a cabo en este trabajo una caracterización exhaustiva del efecto que el sobrepeso ejerce sobre la señalización basal por leptina en el hipotálamo a lo largo del desarrollo, así como de la acción que la leptina ejerce a

corto plazo, tanto en la señalización intracelular como en la expresión génica central de machos y hembras pre- y peripuberales.

En relación con el dimorfismo sexual en los resultados obtenidos surgen varias preguntas de gran interés que deben de investigarse más profusamente. Una de ellas tiene que ver con la necesidad de seguir investigando el papel que la leptina ejerce en el comienzo de la pubertad, desarrollando para ello, modelos experimentales en los que se analice el papel de la hormona en periodos temporales en los que la entrada en pubertad sea inminente. Otra pregunta importante, relacionada con la anterior, es clarificar la posible modulación de SOCS3 en el hipotálamo en respuesta a una determinada concentración circulante de leptina, así como el papel que jugaría BDNF en la respuesta a la hormona anorexigénica, en relación directa con la regulación del equilibrio homeostático y el comienzo de la pubertad.

Los resultados de este trabajo, así como los descubrimientos y avances realizados en los últimos años en relación con la respuesta a la acción de la leptina en individuos con sobrepeso que están a punto de experimentar la entrada en una etapa del desarrollo tan importante como la pubertad, demuestran que a la hora de investigar este proceso y el papel que desempeñan ésta u otras hormonas, se deben de tener muy en cuenta las diferencias sexuales, y enfocar el análisis de las rutas y mecanismos neurohormonales de una manera independiente en cada uno de los sexos.

V. Conclusiones

1. Los niveles circulantes de leptina cambian substancialmente durante el desarrollo de la rata en ambos sexos, implicando funciones heterogéneas en distintas etapas de la vida.
2. La sobrenutrición neonatal y el consiguiente incremento de peso durante el desarrollo de la rata afecta a la señalización basal por leptina en el hipotálamo de las hembras, concretamente, en las etapas postnatal temprana y peripuberal, con afectación de la fosforilación de STAT3. Por el contrario, este hecho no se ha podido demostrar en machos.
3. Los cambios notables en los niveles de SOCS3, aún no bien interpretados, denotan, no obstante, la necesidad de realizar estudios posteriores por su relación prioritaria con la regulación de la señalización por leptina.
4. La sobrenutrición neonatal modifica la respuesta central a un aumento agudo de leptina en las etapas prepuberal y peripuberal de las ratas. Mientras la respuesta en la etapa prepuberal es semejante en ambos sexos, existe un marcado dimorfismo sexual en la etapa peripuberal.
5. Las modificaciones en la respuesta central a un aumento agudo de leptina en la etapa peripuberal de las hembras con sobrepeso están relacionadas con la modulación de rutas hipotalámicas. En cambio, en los machos con sobrepeso esta respuesta central no se ha podido demostrar.
6. La sobrenutrición neonatal modifica diferencialmente las distintas vías de señalización intracelular de la leptina en ambos sexos, sugiriendo una función relevante del sobrepeso en la modulación de la respuesta a esta hormona.

VI. Referencias bibliográficas

- [1] WHO. Overweight and obesity. [sitio web]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
- [2] Barrios V, Chowen JA, Martos-Moreno GA, Frago LM, Argente J. Concepts and trends in obesity and neuropeptide research. *Progress in neuropeptide research*. Nova Science Publishers, 2007.
- [3] Mendieta-Zerón H, López M y Diéguez C. Gastrointestinal peptides controlling body weight homeostasis. *Gen Comp Endocrinol*, 2008; 155(3): 481-95.
- [4] Raj M, Kumar RK. Obesity in children & adolescents. *Indian J Med Res*, 2010; 132(5): 598-607.
- [5] Argente J. Obesity in childhood and adolescence: a heterogeneous disease with new pathophysiological bases. *An Pediatr*, 2010; 75(1): 1-5.
- [6] Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre la Prevención y el Tratamiento de la Obesidad Infantojuvenil. Centro Cochrane Iberoamericano, coordinador. Guía de Práctica Clínica sobre la Prevención y el Tratamiento de la Obesidad Infantojuvenil. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad y Política Social. Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques; 2009. Guías de Práctica Clínica en el SNS: AATRM N° 2007/25.
- [7] Lindström M, Isacson SO, Merlo J. Increasing prevalence of overweight, obesity and physical inactivity: two population-based studies 1986 and 1994. *Eur J Public Health*, 2003; 13(4): 306-12.
- [8] Wang Y, Lobstein T. Worldwide trends in childhood overweight and obesity. *Int J Pediatr Obes*, 2006; 1(1): 11-25.
- [9] Calañas-Contiente A, Arrizabalaga JJ, Caixás A, Cuatrecasas G, Díaz-Fernández MJ, García- Luna PP, et al. Guía para el manejo del sobrepeso y la obesidad en la preadolescencia y la adolescencia: Prevalencia de sobrepeso y obesidad en la adolescencia. *Endocrinol Nutr*, 2008; 55(4): 11-9.
- [10] Flynn MA, McNeil DA, Maloff B, Mutasingwa D, Wu M, Ford C, et al. Reducing obesity and related chronic disease risk in children and youth: a synthesis of evidence with 'best practice' recommendations. *Obes Rev*, 2006; 7(1): 7-66.
- [11] WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Technical report series 894. Geneva: WHO; 2000.
- [12] WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint FAO/WHO Expert consultation. WHO Technical report series 916. Geneva: WHO; 2003.
- [13] Steinberger J, Moran A, Hong CP, Jacobs DR Jr, Sinaiko AR. Adiposity in childhood predicts obesity and insulin resistance in young adulthood. *J Pediatr*, 2001; 138(4): 469-73.
- [14] Guo SS, Wu W, Chumlea WC, Roche AF. Predicting overweight and obesity in adulthood from body mass index values in childhood and adolescence. *Am J Clin Nutr*, 2002; 76(3): 653-8.
- [15] Freedman DS, Khan LK, Serdula MK, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. Interrelationships among childhood BMI, childhood height, and adult obesity: the Bogalusa Heart Study. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004; 28(1): 10-6.

[16] Baird J, Fisher D, Lucas P, Kkeijnen J, Roberts H, Law C. Being big or growing fast: systematic review of size and growth in infancy and later obesity. *BMJ*, 2005; 331(7522): 929.

[17] Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). Consenso SEEDO'2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Rev Esp Obes*, 2007; 5(3): 135-7.

[18] International Obesity Task Force [sitio web]. International Obesity Task Force, European Association for the Study of Obesity. Obesity in Europe. The Case for Action [citado 14 ene 2008]. Disponible en: <http://www.ionf.org/media/euobesity.pdf>

[19] Consejería de Salud de la Junta de Andalucía [sitio web]. Plan Integral de Obesidad Infantil de Andalucía 2007-2012 [citado 14 ene 2008]. Disponible en: <http://www.juntadeandalucia.es/salud/contenidos/planobesidadinfantil/PIOBIN%20BAJA.pdf>

[20] Hampl SE, Carroll CA, Stephen D, Simon SD, Sharma V. Resource Utilization and Expenditures for Overweight and Obese Children. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2007; 161(1): 11-4.

[21] Wang G, Dietz WH. Economic burden of obesity in youths aged 6 to 17 years: 1979-1999. *Pediatrics*, 2002; 109(5): e81.

[22] Ministerio de Sanidad y Consumo. 1ª Conferencia de prevención y promoción de la salud en la práctica clínica en España. Prevención de la obesidad infantil y juvenil. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 2007.

[23] Barker DJ, Fall CH. Fetal and infant origins of cardiovascular disease. *Arch Dis Child*, 1993; 68: 797-799.

[24] Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci*, 1998; 95: 115-28.

[25] Lucas A. Growth and later health: a general perspective. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program, 2010; 65: 1-11.

[26] Mendieta-Zerón H, López M, Diéguez C. Regulación hipotalámica de la ingesta por nutrientes y estado metabólico. *Rev Esp Obes*, 2007; 5 (6): 351-362.

[27] Olson CM, Strawderman MS, Dennison BA. Maternal weight gain during pregnancy and child weight at age 3 years. *Matern Child Health*, 2009; 13: 839-846.

[28] Stuebe AM, Forman MR, Michels KB. Maternal-recalled gestational weight gain, prepregnancy body mass index, and obesity in the daughter. *Int J Obes*, 2009; 33: 743-752.

[29] Bellinger L, Sculley DV, Langley-Evans SC. Exposure to undernutrition in fetal life determines fat distribution, locomotor activity and food intake in ageing rats. *Int J Obes*, 2006; 30: 729-738.

[30] Bayol SA, Simbi BH, Bertrand JA, Stickland NC. Offspring from mothers fed a „junk food“ diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females. *J Physiol*, 2008; 586: 3219-3230.

[31] Chen H, Simar D, Lambert K, Mercier J, Morris MJ. Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. *Endocrinology*, 2008; 149: 5348-5356.

- [32] Shankar K, Kang P, Harrell A, Zhong Y, Marecki JC, Ronis MJ, Badger TM. Maternal overweight programs insulin and adiponectin signaling in the offspring. *Endocrinology*, 2010; 151(6): 2577-2589.
- [33] Centers for Disease Control and Prevention. The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III 1988-94) Reference Manuals and Reports [CD-ROM]. Bethesda, Md: National Center for Health Statistics; 1996.
- [34] Arch JR, Stock MJ, Trayhurn P. Leptin resistance in obese humans: does it exist and what does it mean? *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1998; 22(12): 1159-1163.
- [35] Bonora E, Kiechl S, Willeit J, Oberhollenzer F, Egger G, Bonadonna RC, Muggeo M; Bruneck Study. Metabolic syndrome: epidemiology and more extensive phenotypic description. Cross-sectional data from the Bruneck Study. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003; 27(10): 1283-1289.
- [36] Reilly MP, Rader DJ. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation*, 2003; 108(13): 1546-1551.
- [37] Bowman RE, Maclusky NJ, Sarmiento Y, Frankfurt M, Gordon M, Luine VN. Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses and central neurotransmitters. *Endocrinology*, 2004; 145: 3778-3787.
- [38] Vickers MH, Gluckman PD, Conveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH, Harris M. The effect of neonatal leptin treatment on postnatal weight gain in male rats is dependent on maternal nutritional status during pregnancy. *Endocrinology*, 2008; 129: 1906-1913.
- [39] García-Cáceres C, Diz-Chaves Y, Lagunas N, Calmarza-Font I, Azcoitia I, García-Segura LM, Frago LM, Argente J, Chowen JA. The weight gain response to stress during adulthood is conditioned by both sex and prenatal stress exposure. *Psychoneuroendocrinology*, 2010; 35: 403-413.
- [40] Plagemann A, Harder T, Janert U, Rake A, Rittel F, Rohde W, Dörner G. Malformations of hypothalamic nuclei in hyperinsulinemic offspring of rats with gestational diabetes. *Dev Neurosci*, 1999; 21: 58-67.
- [41] Huizinga CT, Oudejans CBM, Delemarre-van de Waal HA. Persistent changes in somatostatin and neuropeptide Y mRNA levels but not in growth hormone-releasing hormone mRNA levels in adult rats after intrauterine growth retardation. *J Endocrinol*, 2001; 168: 273-281.
- [42] Boullu-Ciocca S, Dutour A, Guillaume V, Achard V, Oliver C, Grino M. Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes*, 2005; 54: 197-203.
- [43] Boullu-Ciocca S, Achard V, Tassistro V, Dutour A, Grino M. Postnatal programming of glucocorticoid metabolism in rats modulates high-fat diet-induced regulation of visceral adipose tissue glucocorticoid exposure and sensitivity and adiponectin and proinflammatory adipokines gene expression in adulthood. *Diabetes*, 2008; 57: 669-677.
- [44] Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr*, 2002; 76: 911-922.

- [45] Erhuma A, Bellinger L, Langley-Eans SC, Bennett AJ. Prenatal exposure to undernutrition and programming of responses to high-fat feeding in the rat. *Br J Nutr*, 2007; 98: 517-524.
- [46] Gibson SA. Sugar-sweetened soft drinks and obesity: a systematic review of the evidence from observational studies and interventions. *Nutr Res Rev*, 2008; 21: 134-147.
- [47] Glavas MM, Kirigiti MA, Xiao XQ, Enriori PJ, Fisher SK, Evans AE, Grayson BE, Cowley MA, Smith MS, Grove KL. Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet. *Endocrinology*, 2010; 151: 1598-1610.
- [48] Hofmann SM, Tschöp MH. Dietary sugars: a fat difference. *J Clin Invest*, 2009; 119: 1089-1092.
- [49] de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*, 1999; 99(6): 779–785.
- [50] Pi-Sunyer FX. Use of lifestyle changes treatment plans and drug therapy in controlling cardiovascular and metabolic risk factors. *Obesity*, 2006; 14(3): 135–142.
- [51] Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Król E. The contribution of animal models to the study of obesity, 2008; 4: 413-32.
- [52] Benarroch EE. Neural control of feeding behavior: overview and clinical correlations. *Neurology*, 2010; 74(20.): 1643–1650.
- [53] Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 2000; 404: 661-671.
- [54] Horvath TL. The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nature Neuroscience*, 2005; 8: 561-565.
- [55] Fioramonti X, Contié S, Song Z, Routh VH, Lorsignol A, Pénicaud L. Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus. *Diabetes*, 2007; 56: 1219-1227.
- [56] Simpson KA, Martin NM, Bloom SR. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2009; 53(2): 120–128.
- [57] Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev*, 2005; 85(4): 1131–1158.
- [58] Suzuki K, Simpson KA, Minnion JS, Shillito JC, Bloom SR. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocrinol J*, 2010; 57(5): 359–372
- [59] Haines DE. Lippincott's Illustrated Q&A Review of Neuroscience. 2010. ISBN/ISSN: 9781605478227.
- [60] Suzuki K, Jayasena CN, Bloom SR. Obesity and appetite control. *Exp Diabetes Res*, 2012; 2012: 824305.
- [61] Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 1997; 88(1): 131–141.
- [62] Butler AA, Kesterson RA, Khong K, Cullen MJ, Pellemounter MA, Dekoning J, Baetscher M, Cone RD. A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology*, 2000; 141: 3518–3521.

- [63] Sutton GM, Trevaskis JL, Hulver MW, McMillan RP, Markward NJ, Babin MJ, Meyer EA, Butler AA. Diet-genotype interactions in the development of the obese, insulin-resistant phenotype of C57BL/6J mice lacking melanocortin-3 or -4 receptors. *Endocrinology*, 2006; 147: 2183–2196.
- [64] Butler AA, Marks DL, Fan W, Kuhn CM, Bartolome M, Cone RD. Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. *Nat Neurosci*, 2001; 4: 605–611.
- [65] Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, Ferreira M, Tang V, McGovern RA, Kenny CD, Christiansen LM, Edelstein E, Choi B, Boss O, Aschkenasi C, Zhang CY, Mountjoy K, Kishi T, Elmquist JK, Lowell BB. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell*, 2005; 123: 493–505.
- [66] Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibult O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Sina M, Gorg T, Mayer H, Siegfried W, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J. Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; 84: 1483–1486.
- [67] Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet*, 1998; 20: 113–114.
- [68] Barsh GS, Farooqi IS, O'Rahilly S. Genetics of body-weight regulation. *Nature*, 2000; 404: 644–651.
- [69] Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Eng J Med*, 2003; 348: 1085–1095.
- [70] Kristensen P, Judge ME, Thim L. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, 1998; 393: 72–76.
- [71] Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95(25): 15043–15048.
- [72] Allen YS, Adrian TE, Allen JM. Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science*, 1983; 221: 877–879.
- [73] Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology*, 1984; 115(1): 427–429.
- [74] Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides*, 1986; 7(6): 1189–1192.
- [75] Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*, 278: 135–138.
- [76] Hentges ST, Nishiyama M, Overstreet LS, Stenzel-Poore M, Williams JT, Low MJ. GABA release from proopiomelanocortin neurons, *J Neurosci*, 2004; 24: 1578–1583.
- [77] Horvath TL, Bechmann I, Naftolin F, Kalra SP, Leranath C. Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Res*, 1997; 756: 283–286.

- [78] Leibowitz SF, Hammer NJ, Chang K. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiology & Behavior*, 1981; 27(6): 1031–1040.
- [79] Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 2001; 107(3): 379–386.
- [80] Marsh DJ, Weingarth DT, Novi DE. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99(5): 3240–3245.
- [81] Sakurai T, Amemiya A, Ishii M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behaviour. *Cell*, 1998; 92(4): 573–585.
- [82] Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol*, 2005; 184(2): 291–318.
- [83] Jacobowitz DM, O'Donohue TL. α -Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978; 75(12): 6300–6304.
- [84] Guan XM, Yu H, Trumbauer M, Frazier E, Van der Ploeg LH, Chen H. Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice. *Neuroreport*, 1998; 9(15): 3415–3419.
- [85] Bernardis LL, Bellinger LL. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Research*, 1987; 434(3): 321–381.
- [86] Xu B, Goulding EH, Zang K. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature Neuroscience*, 2003; 6(7): 736–742.
- [87] Gonzalez JA, Reimann F, Burdakov D. Dissociation between sensing and metabolism of glucose in sugar sensing neurons. *J Physiol*, 2009; 587(1): 41–48.
- [88] Liao GY, An JJ, Gharami K, Waterhouse EG, Vanevski F, Jones KR, Xu B. Dendritically targeted Bdnf mRNA is essential for energy balance and response to leptin. *Nat Med*, 2012; 18(4): 564–71.
- [89] Michel MC, Beck-Sickinger A, Cox H. XVI International union of pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol Rev*, 1998; 50(1): 143–150.
- [90] Lin S, Boey D, Herzog H. NPY and Y receptors: lessons from transgenic and knockout models. *Neuropeptides*, 38(4): 189–200.
- [91] Tatemoto K, Mutt V. Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature*, 1980; 285: 417–418.
- [92] Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR. Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*, 1985; 89(5): 1070–1077.
- [93] Bartolome MA, Borque M, Martinez-Sarmiento J. Peptide YY secretion in morbidly obese patients before and after vertical banded gastroplasty. *Obes Surg*, 2002; 12(3): 324–327, 2002.

- [94] Misra M, Miller KK, Tsai P. Elevated peptide YY levels in adolescent girls with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006; 91(3): 1027–1033.
- [95] Asakawa A, Inui A, Yuzuriha H. Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology*, 2003; 124(5): 1325–1336.
- [96] Parker RM, Herzog H. Regional distribution of Yreceptor subtype mRNAs in rat brain. *Eur J Neuron*, 1999; 11(4): 1431–1448.
- [97] Adrian TE, Bloom SR, Bryant MG, Polak JM, Heitz PH, Barnes AJ. Distribution and release of human pancreatic polypeptide. *Gut*, 1976; 17(12): 940–944.
- [98] Uhe AM, Szmukler GI, Collier GR, Hansky J, O'Dea K, Young GP. Potential regulators of feeding behavior in anorexia nervosa. *Am J Clin Nutr*, 1992; 55(1): 28–32.
- [99] Zipf WB, O'Dorisio TM, Cataland S, Dixon K. Pancreatic polypeptide responses to proteinmeal challenges in obese but otherwise normal children and obese children with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 1983; 57(5): 1074–1080.
- [100] Tucker JD, Dhanvantari S, Brubaker PL. Proglucagon processing in islet and intestinal cell lines. *Reg Pep*, 1996; 62(1): 29–35.
- [101] Orskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes*, 1994; 43(4): 535–539.
- [102] Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ, Ørskov C. Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience*, 1997; 77(1): 257–270.
- [103] Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Glucagonlike peptide-1 receptor (GLP1-R) mRNA in the rat hypothalamus. *Endocrinology*, 1996; 137(11): 5159–5162.
- [104] Harkavyi A and Whitton PS. Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation as a means of neuroprotection. *Brit J Pharm*, 2010; 159(3): 495–501.
- [105] Cummings DE and Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest*, 2007; 117(1): 13–23.
- [106] Vahl TP, Drazen DL, Seeley RJ, D'Alessio DA, Woods SC. Meal-anticipatory glucagon-like peptide-1 secretion in rats. *Endocrinology*, 2010; 151(2): 569–575.
- [107] Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev*, 2007; 87(4): 1409–1439.
- [108] Ghatei MA, Uttenthal LO, Christofides ND, Bryant MG, Bloom SR. Molecular forms of human enteroglucagon in tissue and plasma: plasma responses to nutrient stimuli in health and in disorders of the upper gastrointestinal tract. *J Clin Endocrinol Metab*, 1983; 57(3): 488–495.
- [109] Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ. Oxyntomodulin from distal gut. Role in regulation of gastric and pancreatic functions. *Dig Dis Sci*, 1988; 34(9): 1411–1419.
- [110] Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW. Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans. *J Clin Endo Metab*, 2003; 88(10): 4696–4701.

- [111] Dakin CL, Gunn I, Small CJ. Oxyntomodulin inhibits food intake in the rat. *Endocrinology*, 2001; 42(10): 4244–4250.
- [112] Baggio LL, Huang Q, Brown TJ, Drucker DJ. Oxyntomodulin and glucagon-like peptide-1 differentially regulate murine food intake and energy expenditure. *Gastroenterology*, 2004; 127(2): 546–558.
- [113] Fehmann HC, Jiang J, Schweinfurth J, Wheeler MB, Boyd AE, Goke B. Stable expression of the rat GLP-I receptor in CHO cells: activation and binding characteristics utilizing GLP-I(7-36)-amide, oxyntomodulin, exendin- 4, and exendin(9-39). *Peptides*, 1994; 15(3): 453–456.
- [114] Jones BJ, Tan T, Bloom SR. Minireview: glucagon in stress and energy homeostasis. *Endocrinology*, 2012; 153(3): 1049–1054.
- [115] Geary N, Kissileff HR, Pi-Sunyer FX, Hinton V. Individual, but not simultaneous, glucagon and cholecystokinin infusions inhibit feeding in men. *Am J Physiol*, 1992; 262(6): 975–980.
- [116] Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 1999; 402: 656–660.
- [117] Date Y, Kojima M, Hosoda H. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*, 2000; 141(11): 4255– 4261.
- [118] Cowley MA, Smith RG, Diano S. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, 2003; 37(4): 649–661.
- [119] Muccioli G, Tschöp M, Papotti M, Deghenghi R, Heiman M, Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol*, 2002; 440(2-3): 235-254.
- [120] Heppner KM, Tong J, Kirchner H, Nass R, Tschöp MH. The ghrelin O-acyltransferase–ghrelin system: a novel regulator of glucose metabolism. *Diabetes & Obesity*, 2011; 18: 50-55.
- [121] Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 2000; 407: 908–913.
- [122] Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, 2001; 50(8): 1714–1719.
- [123] Murakami N, Hayashida T, Kuroiwa T. Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. *J Endocrinol*, 2002; 174(2): 283–288.
- [124] Nakazato M, Murakami N, Date Y. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 2001; 409: 194–198.
- [125] Otto B, Cuntz U, Fruehauf E. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*, 2001; 145(5) 669–673.
- [126] Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Eng J Med*, 2002; 346(21): 1623–1630.

- [127] le Roux CW, Patterson M, Vincent RP, Hunt C, Ghatei MA, Bloom SR. Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal calorie content in normalweight but not obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90(2): 1068–1071.
- [128] Cummings DE, Clement K, Purnell JQ. Elevated plasma ghrelin levels in Prader-Willi syndrome. *Nat Med*, 2002; 8(7): 643–644.
- [129] Wang L, Saint-Pierre DH, Tache Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y—synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neur Lett*, 2002; 325(1): 47–51.
- [130] Chen hy, Trumbauer ME, Chen AS. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology*, 145(6): 2607–2612.
- [131] Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM, Luckman SM. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology*, 2002; 143(1): 155–162.
- [132] Date Y, Murakami N, Toshinai K. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*, 2002; 123(4): 1120–1128.
- [133] Zhao CM, Furnes MW, Stenstrom B, Kulseng B, Chen D. Characterization of obestatin- and ghrelin-producing cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rats: an immunohistochemical and electron-microscopic study. *Cell & Tissue Research*, 2008; 331(3): 575–587.
- [134] Lacquaniti A, Donato V, Chirico V, Buemi A, Buemi M. Obestatin: an interesting but controversial gut hormone. *An Nutr Metab*, 2011; 59: 193–199.
- [135] Gourcerol G, Coskun T, Craft LS. Preproghrelin-derived peptide, obestatin, fails to influence food intake in lean or obese rodents. *Obesity*, 2007; 15(11): 2643–2652.
- [136] Gibbs J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psycho*, 1973; 84(3): 488–495.
- [137] Liddle RA, Goldfine ID, Rosen MS, Taplitz RA, Williams JA. Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J Clin Invest*, 1985; 75(4): 1144–1152.
- [138] Kissileff HR, Pi-Sunyer FX, Thornton J, Smith GP. C-terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in man. *Am J Clin Nut*, 1981; 34(2): 154–160.
- [139] West DB, Fey D, Woods SC. Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in freefeeding rats. *Am J Physiol*, 1984; 226(5): 776–787.
- [140] Wank SA. Cholecystokinin receptors. *Am J Physiol*, 1995; 269(5): 628–646.
- [141] Moran TH, Baldessarini AR, Salorio CF, Lowery T, Schwartz GJ. Vagal afferent and efferent contributions to the inhibition of food intake by cholecystokinin. *Am J Physiol*, 1997; 272(4): 1245–1251.
- [142] Barrachina MD, Martínez V, Wang L, Wei JY, Tache Y. Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94(19): 10455–10460.

- [143] Rushing PA, Hagan MM, Seeley RJ, Lutz TA, Woods SC. Amylin: a novel action in the brain to reduce body weight. *Endocrinology*, 2000; 141(2): 850–853.
- [144] Reinehr T, de Sousa G, Niklowitz P, Roth CL. Amylin and its relation to insulin and lipids in obese children before and after weight loss. *Obesity*, 2007; 15(8): 2006–2011.
- [145] Avram AS, Avram MM, James WD. Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J Am Acad Derm*, 2005; 53: 671–683.
- [146] Feve B. Adipogenesis: Cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2005; 19: 483–499.
- [147] Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: A growing understanding of adipocyte differentiation. *Endocrinology*, 2011; 12: 722–734.
- [148] Majka SM, Barak Y, Klemm DJ. Concise review: Adipocyte origins: Weighing the possibilities. *Stem Cells*, 2011; 29: 1034–1040.
- [149] Martos-Moreno GA, Barrios V, Chowen JA, Argente J. Adipokines in childhood obesity. *Vitam Horm*. 2013; 91:107-42.
- [150] Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89: 2548–2556.
- [151] Schaffler A, Scholmerich J, Buechler C. The role of ‘adipotropins’ and the clinical importance of a potential hypothalamic-pituitary-adipose axis. *Endocrinol Metab*, 2006; 2: 374–383.
- [152] Symonds ME, Mostyn A, Pearce S, Budge H, Stephenson T. Endocrine and nutritional regulation of fetal adipose tissue development. *J Endocrinol*, 2003; 179: 293–299.
- [153] Prins JB, O’Rahilly S. Regulation of adipose cell number in man. *Clin Sci*, 1997; 92:3–11.
- [154] Coppack SW. Adipose tissue changes in obesity. *Biochem Soc Trans*, 2005; 33: 1049–1052.
- [155] Fain JN. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm*, 2006; 74: 443–477.
- [156] Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hausner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007; 92: 1023–1033.
- [157] Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev*, 2001; 2: 239–254.
- [158] Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*, 2007; 56: 16–23.
- [159] Tsuchida A, Yamauchi T, Kadowaki T. Nuclear receptors as targets for drug development: Molecular mechanisms for regulation of obesity and insulin resistance by peroxisome proliferator-activated receptor gamma, CREB-binding protein, and adiponectin. *J Pharmacological Sci*, 2005; 97: 164–170.

- [160] Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 2008; 453: 783–787.
- [161] Martos-Moreno GA, Chowen JA, Argente J. Metabolic signals in human puberty: Effects of over and undernutrition. *Mol Cell Endocrinol*, 2010; 324: 70–81.
- [162] Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 1988; 37: 1595–1607.
- [163] Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome. *Endocrinol Rev*, 2000; 21: 697–738.
- [164] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994; 372: 425–432.
- [165] Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 1995; 83: 1263–1271.
- [166] Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 1997; 387: 903–908.
- [167] Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Eng J Med*, 2007; 356: 237–247.
- [168] Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/ metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*, 2002; 110: 1093–1103.
- [169] Meier U & Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: Review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem*, 2004; 50: 1511–1525.
- [170] Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim SY. Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011; 301: 567–584.
- [171] Denver RJ, Bonett RM, Boorse GC. Evolution of leptin structure and function. *Neuroendocrinology*, 2011; 94: 21–38.
- [172] Gautron L, Elmquist JK. Sixteen years and counting: An update on leptin in energy balance. *J Clin Invest*, 2011; 121: 2087–2093.
- [173] Korner A, Kratzsch J, Kiess W. Adipocytokines: Leptin—The classical, resistin—The controversial, adiponectin—The promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2005; 19: 525–546.
- [174] Landt M. Leptin binding and binding capacity in serum. *Clin Chem*, 2000; 46, 379–384.
- [175] Argente J, Barrios V, Chowen JA, Sinha MK, Considine RV. Leptin plasma levels in healthy Spanish children and adolescents, children with obesity, and adolescents with anorexia nervosa and bulimia nervosa. *J Pediatr*, 1997; 131: 833–838.
- [176] Sone M, Osamura RY. Leptin and the pituitary. *Pituitary*, 2001; 4: 15–23.

- [177] Koutkia P, Canavan B, Johnson ML, DePaoli A, Grinspoon S. Characterization of leptin pulse dynamics and relationship to fat mass, growth hormone, cortisol, and insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003; 285: 372–379.
- [178] Schwartz MW, Niswender KD. Adiposity signaling and biological defense against weight gain: Absence of protection or central hormone resistance? *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89: 5889–5897.
- [179] Williams KW, Scott MM, Elmquist JK. Modulation of the central melanocortin system by leptin, insulin, and serotonin: co-ordinated actions in a dispersed neuronal network. *Eur J Pharmacol*, 2011; 660(1): 2-12.
- [180] Myers MG, Cowley MA, Munzberg H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol*, 2008; 70: 537–556.
- [181] Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG Jr. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem*. 2000; 275:14563–14572.
- [182] Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW, Myers MG Jr. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature*. 2003; 421: 856–859.
- [183] Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T, Kitamura T, Dikic I, Yoshimura A. CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem*, 2000; 275: 29338–29347.
- [184] Dunn SL, Bjornholm M, Bates SH, Chen Z, Seifert M, Myers MG Jr. Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signaling via Tyr1138 of the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3. *Mol Endocrinol*, 2005; 19: 925–938.
- [185] Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, Kim YB, Elmquist JK, Tartaglia LA, Kahn BB, Neel BG. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell*, 2002; 2: 489–495.
- [186] Belgardt BF, Husch A, Rother E, Ernst MB, Wunderlich FT, Hampel B, Klöckener T, Alessi D, Kloppenburg P, Brüning JC. PDK1 deficiency in POMC expressing cells reveals FOXO1-dependent and -independent pathways in control of energy homeostasis and stress response. *Cell Metab*, 2008; 7: 291–301.
- [187] Qiu J, Fang Y, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. Leptin excites proopiomelanocortin neurons via activation of TRPC channels. *J Neurosci*, 2010; 30:1560–1565.
- [188] Blouet C, Ono H, Schwartz GJ. Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis. *Cell Metab*, 2008; 8: 459–467.
- [189] Cota D, Matter EK, Woods SC, Seeley RJ. The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity. *J Neurosci*, 2008; 28: 7202–7208.
- [190] Ning K, Miller LC, Laidlaw HA, Burgess LA, Perera NM, Downes CP, Leslie NR, Ashford ML. A novel leptin signalling pathway via PTEN inhibition in hypothalamic cell lines and pancreatic beta-cells. *EMBO J*, 2006; 25(11): 2377-87.
- [191] Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem*, 2000; 275: 15985–15991.

- [192] Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, Hotamisligil GS, Van Obberghen E. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem*, 2001; 276: 47944–47949.
- [193] Stoll-Becker S., Kreuder J, Reiss I, Etspuler J, Blum WF, Gortner L. Influence of gestational age and intrauterine growth on leptin concentrations in venous cord blood of human newborns. *Klin Padiatr*, 2003; 215: 3–8.
- [194] Martos-Moreno GA, Barrios V, Sáenz de Pipaón M, Pozo J, Dorronsoro I, Martínez-Biarge M, Quero J, Argente J. Influence of prematurity and growth restriction on the adipokine profile, IGF1, and ghrelin levels in cord blood: Relationship with glucose metabolism. *Eur J Endocrinol*, 2009; 161: 381–389.
- [195] Ong KK, Ahmed ML, Sherriff A, Woods KA, Watts A, Golding J. Cord blood leptin is associated with size at birth and predicts infancy weight gain in humans. ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; 84: 1145–1148.
- [196] Lepercq J, Challier JC, Guerre-Millo M, Cauzac M, Vidal H, Hauguel-de Mouzon S. Prenatal leptin production: Evidence that fetal adipose tissue produces leptin. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86: 2409–2413.
- [197] Martos-Moreno GA, Barrios V, Argente J. Normative data for adiponectin, resistin, interleukin 6, and leptin/receptor ratio in a healthy Spanish pediatric population: Relationship with sex steroids. *Eur J Endocrinol*, 2006; 155: 429–434.
- [198] Landt M, Parvin CA, Wong M. Leptin in cerebrospinal fluid from children: Correlation with plasma leptin, sexual dimorphism, and lack of protein binding. *Clin Chem*, 2000; 46: 854–858.
- [199] Misra M, Miller KK, Almazan C, Ramaswamy K, Aggarwal A, Herzog DB. Hormonal and body composition predictors of soluble leptin receptor, leptin, and free leptin index in adolescent girls with anorexia nervosa and controls and relation to insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89: 3486–3495.
- [200] Wilasco MI, Goldani HA, Dornelles CT, Maurer RL, Kieling CO, Porowski M. Ghrelin, leptin and insulin in healthy children: Relationship with anthropometry, gender, and age distribution. *Reg Pep*, 2012; 173: 21–26.
- [201] Wabitsch M, Blum WF, Mucic R, Braun M, Hube F, Rascher W. Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Invest*, 1997; 100: 808–813.
- [202] Plant TM, Barker G, Mandi L. Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates. *Hum Reprod Update*. 2004; 10: 67–77.
- [203] Sisk CL, Foster DL. The neural basis of puberty and adolescence. *Nat Neurosci*, 2004; 7: 1040–1047.
- [204] Elias CF. Leptin action in pubertal development: recent advances and unanswered questions. *Trends Endocrinol Metab*, 2012; 23(1): 9–15.
- [205] Kurian JR & Terasawa E. Epigenetic control of gonadotropin releasing hormone neurons. *Front Endocrinol*, 2013; 4: 61.

- [206] Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, Matagne V, Mungenast AE. Minireview: The Neuroendocrine Regulation of Puberty: Is the Time Ripe for a Systems Biology Approach? *Endocrinology*, 2006; 147: 1166–1174.
- [207] Clarkson J, Herbison AE. Development of GABA and glutamate signaling at the GnRH neuron in relation to puberty. *Mol Cell Endocrinol*, 2006; 254–255: 32–38.
- [208] Choi J, Ha CM, Choi EJ, Jeong CS, Park JW, Baik JH, Park JY, Costa ME, Ojeda SR, Lee BJ. Kinesin Superfamily-Associated Protein 3 Is Preferentially Expressed in Glutamatergic Neurons and Contributes to the Excitatory Control of Female Puberty. *Endocrinology*, 2008; 149: 6146–6156.
- [209] Mayer C, Acosta-Martinez M, Dubois SL, Wolfe A, Radovick S, Boehm U, Levine JE. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor alpha-signaling in kisspeptin neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; 107: 22693–22698.
- [210] Roa J, Tena-Sempere M. Energy balance and puberty onset: emerging role of central mTOR signaling. *Trends Endocrinol Metab*, 2010; 21: 519–528.
- [211] Kennedy GC, Mitra J. Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J Physiol*. 1963; 166: 408–418.
- [212] Frisch RE, Revelle R. Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weights and adolescent events. *Science*. 1970; 169: 397–399.
- [213] Walvoord EC. The Timing of Puberty: Is It Changing? Does It Matter? *J Adolesc Health*, 2010; 47: 433–439.
- [214] Ong KK, Ahmed ML, Dunger DB. Lessons from large population studies on timing and tempo of puberty (secular trends and relation to body size): the European trend. *Mol Cell Endocrinol*. 2006; 254–255: 8–12.
- [215] Kaplowitz P. Pubertal development in girls: secular trends. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006; 18: 487–491.
- [216] Biro FM, Galvez MP, Greenspan LC, Succop PA, Vangeepuram N, Pinney SM, Teitelbaum S, Windham GC, Kushi LH, Wolff MS. Pubertal Assessment Method and Baseline Characteristics in a Mixed Longitudinal Study of Girls. *Pediatrics*, 2010; 126: 583–590.
- [217] Herman-Giddens ME, Slora EJ, Wasserman RC, Bourdony CJ, Bhapkar MV, Koch GG, Hasemeier CM. Secondary Sexual Characteristics and Menses in Young Girls Seen in Office Practice: A Study from the Pediatric Research in Office Settings Network. *Pediatrics*, 1997; 99: 505–512.
- [218] Solorzano CM, McCartney CR. Obesity and the pubertal transition in girls and boys. *Reproduction*. 2010; 140: 399–410.
- [219] Ong KK, Emmett P, Northstone K, Golding J, Rogers I, Ness AR, Wells JC, Dunger DB. Infancy weight gain predicts childhood body fat and age at menarche in girls. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009; 94: 1527–1532.
- [220] Rosenfield RL, Lipton RB, Drum ML. Thelarche, pubarche, and menarche attainment in children with normal and elevated body mass index. *Pediatrics*, 2009; 123: 84–88.
- [221] Simpson ER. Aromatase: Biologic Relevance of Tissue-Specific Expression. *Semin Reprod Med*, 2004; 22: 11, 23.

- [222] Dunger DB, Ahmed ML, Ong KK. Effects of obesity on growth and puberty. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2005; 19: 375–390.
- [223] Jasik CB, Lustig RH. Adolescent Obesity and Puberty: The “Perfect Storm”. *Ann NY Acad Sci*; 2008; 1135: 265–279.
- [224] Bordini B, Littlejohn E, Rosenfield RL. LH Dynamics in Overweight Girls with Premature Adrenarche and Slowly Progressive Sexual Precocity. *Int J Pediatr Endocrinol*, 2010: 2010.
- [225] Ahmed ML, Ong KK, Dunger DB. Childhood obesity and the timing of puberty. *Trend Endocrinol Metab*. 2009; 20: 237–242.
- [226] Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Hamilton BD, Carrell DT. Obesity and Male Reproductive Potential. *J Androl*, 2006; 27: 619–626.
- [227] Schneider JE. Energy balance and reproduction. *Physiol Beba*, 2004; 81: 289–317.
- [228] Farooqi IS. Leptin and the onset of puberty: insights from rodent and human genetics. *Semin Reprod Med*. 2002; 20: 139–144.
- [229] Batt RAL, Everard DM, Gillies G, Wilkinson M, Wilson CA, Yeo TA. Investigation into the hypogonadism of the obese mouse (genotype ob/ob). *J Reprod Fertil*. 1982; 64: 363–371.
- [230] Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology*. 1997; 138: 1190–1193.
- [231] Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*. 1996; 137: 3144–3147.
- [232] Donato J Jr, Cravo RM, Frazao R, Gautron L, Scott MM, Lachey J, Castro IA, Margatho LO, Lee S, Lee C, et al. Leptin’s effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *J Clin Invest*, 2011; 121: 355–368.
- [233] Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J. Human Leptin Deficiency Caused by a Missense Mutation: Multiple Endocrine Defects, Decreased Sympathetic Tone, and Immune System Dysfunction Indicate New Targets for Leptin Action, Greater Central than Peripheral Resistance to the Effects of Leptin, and Spontaneous Correction of Leptin-Mediated Defects. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; 84: 3686–3695.
- [234] Murray PG, Read A, Banerjee I, Whatmore AJ, Pritchard LE, Davies RA, Brennand J, White A, Ross RJ, Clayton PE. Reduced appetite and body mass index with delayed puberty in a mother and son: association with a rare novel sequence variant in the leptin gene. *Eur J Endocrinol*, 2011; 164: 521–527.
- [235] de Luca C, Kowalski TJ, Zhang Y, Elmquist JK, Lee C, Kilimann MW, Ludwig T, Liu SM, Chua SC Jr. Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes. *J Clin Invest*, 2005; 115: 3484–3493.
- [236] Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*, 1998; 392: 398–401.

- [237] Lebrethon MC, Vandersmissen E, Gerard A, Parent AS, Junien JL, Bourguignon JP. In vitro stimulation of the prepubertal rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator by leptin and neuropeptide Y through distinct mechanisms. *Endocrinology*, 2000; 141:1464–1469.
- [238] Wójcik-Gładysz A, Wankowska M, Misztal T, Romanowicz K, Polkowska J. Effect of intracerebroventricular infusion of leptin on the secretory activity of the GnRH/LH axis in fasted prepubertal lambs. *Anim Reprod Sci*, 2009; 114: 370–383.
- [239] Donato J Jr, Cravo RM, Frazao R, Elias CF. Hypothalamic sites of leptin action linking metabolism and reproduction. *Neuroendocrinology*, 2011; 93: 9–18.
- [240] Quennell JH, Mulligan AC, Tups A, Liu X, Phipps SJ, Kemp CJ, Herbison AE, Grattan DR, Anderson GM. Leptin Indirectly Regulates Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Function. *Endocrinology*, 2009; 150: 2805–2812.
- [241] Louis GW, Greenwald-Yarnell M, Phillips R, Coolen LM, Lehman MN, Myers MG. Molecular Mapping of the Neural Pathways Linking Leptin to the Neuroendocrine Reproductive Axis. *Endocrinology*, 2011; 152: 2302–2310.
- [242] Cravo RM, Margatho LO, Osborne-Lawrence S, Donato J Jr, Atkin S, Bookout AL, Rovinsky S, Frazao R, Lee CE, Gautron L, et al. Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. *Neuroscience*, 2011; 173: 37–56.
- [243] Tena-Sempere M. Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges. *Mol Cell Endocrinol*, 2010; 314: 164–169.
- [244] de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003; 100: 10972–10976.
- [245] Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*, 2003; 349: 1614–1627.
- [246] Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol*, 2006; 18: 298–303.
- [247] Qiu J, Fang Y, Bosch MA, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. Guinea pig kisspeptin neurons are depolarized by leptin via activation of TRPC channels. *Endocrinology*, 2011; 152: 1503–1514.
- [248] Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, Vazquez MJ, Vigo E, Casanueva FF, Aguilar E, et al. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology*, 2005; 146: 3917–3925.
- [249] Kalamatianos T, Grimshaw SE, Poorun R, Hahn JD, Coen CW. Fasting reduces KiSS-1 expression in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV): effects of fasting on the expression of KiSS-1 and neuropeptide Y in the AVPV or arcuate nucleus of female rats. *J Neuroendocrinol*, 2008; 20: 1089–1097.
- [250] Quennell JH, Howell CS, Roa J, Augustine RA, Grattan DR, Anderson GM. Leptin Deficiency and Diet-Induced Obesity Reduce Hypothalamic Kisspeptin Expression in Mice. *Endocrinology*, 2011.
- [251] Mayer C, Boehm U. Female reproductive maturation in the absence of kisspeptin/GPR54 signaling. *Nat Neurosci*, 2011; 14: 704–710.

- [252] Leshan RL, Louis GW, Jo Y-H, Rhodes CJ, Munzberg H, Myers MG Jr. Direct Innervation of GnRH Neurons by Metabolic- and Sexual Odorant-Sensing Leptin Receptor Neurons in the Hypothalamic Ventral Premammillary Nucleus. *J Neurosci* 2009; 29: 3138–3147.
- [253] Donato J Jr, Cavalcante JC, Silva RJ, Teixeira AS, Bittencourt JC, Elias CF. Male and female odors induce Fos expression in chemically defined neuronal population. *Physiol Behav*, 2010; 99: 67–77.
- [254] Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Projections of the ventral premammillary nucleus. *J Comp Neurol*, 1992; 324: 195–212.
- [255] Rondini TA, Baddini SP, Sousa LF, Bittencourt JC, Elias CF. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript neurons project to areas expressing gonadotropin releasing hormone immunoreactivity and to the anteroventral periventricular nucleus in male and female rats. *Neuroscience*, 2004; 125: 735–748.
- [256] Donato J Jr, Frazao R, Fukuda M, Vianna CR, Elias CF. Leptin induces phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase in defined hypothalamic neurons. *Endocrinology*, 2010; 151: 5415–5427.
- [257] Williams KW, Sohn J-W, Donato J Jr, Lee CE, Zhao JJ, Elmquist JK, Elias CF. The acute effects of leptin require PI3K signaling in the hypothalamic ventral premammillary nucleus. *J Neurosci*, 2011.
- [258] Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang FP, Pinilla L, Gonzalez LC, Dieguez C, Huhtaniemi I, Aguilar E. Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. *J Endocrinol*, 2001; 170: 413–423.
- [259] Geisler J, Haynes B, Ekse D, Dowsett M, Lønning PE. Total body aromatization in postmenopausal breast cancer patients is strongly correlated to plasma leptin levels. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007; 104: 27–34.
- [260] Krinke GJ. *The Laboratory Rat (Handbook of Experimental Animals)*. Academic Press, 2000.
- [261] Morrison CD, Morton GJ, Niswender KD, Gelling RW, Schwartz MW. Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005; 289(6): 1051-7.
- [262] Sánchez-Criado JE, Bellido C, Galiot F, López FJ, Gaytán F. A possible dual mechanism of the anovulatory action of antiprogestone RU486 in the rat. *Biol Reprod*, 1990; 42(5-6): 877-86.
- [263] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248-254.
- [264] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001; 29(9): 45.
- [265] Matthews SG. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab*, 2002; 13: 373–380.

- [266] Fuente-Martín E, García-Cáceres C, Granado M, Sánchez-Garrido MA, Tena-Sempere M, Frago LM, Argente J, Chowen JA. Early postnatal overnutrition increases adipose tissue accrual in response to a sucrose-enriched diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012; 302: 1586–1598.
- [267] Fuente-Martín E, García-Cáceres C, Granado M, de Ceballos ML, Sánchez-Garrido MÁ, Sarman B, Liu ZW, Dietrich MO, Tena-Sempere M, Argente-Arizón P, Díaz F, Argente J, Horvath TL, Chowen JA. Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes. *J Clin Invest*, 2012; 122(11): 3900-13.
- [268] Fuente-Martín E, Granado M, García-Cáceres C, Sanchez-Garrido MA, Frago LM, Tena-Sempere M, Argente J, Chowen JA. Early nutritional changes induce sexually dimorphic long-term effects on body weight gain and the response to sucrose intake in adult rats. *Metabolism*, 2012; 61(6): 812-22.
- [269] Sumova A, Bendova Z, Sladek M, Kovacikova Z, Illnerova H. Seasonal molecular timekeeping within the rat circadian clock. *Physiol Res*, 2004; 53(1): S167-S176.
- [270] Garaulet M, Ordovás JM, Madrid JA. The chronobiology, etiology and pathophysiology of obesity. *Int J Obes*, 2010; 34(12): 1667-83.
- [271] Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging. Slawik M, Vidal-Puig AJ. *Ageing Res Rev*, 2006; 5(2): 144-64.
- [272] Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel FL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 2003; 112: 1796–1808.
- [273] Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*, 2007; 132: 2169–2180.
- [274] Karagiannides I, Tchkonja T, Dobson DE, Steppan CM, Cummins P, Chan G, Salvatori K, Hadzopoulou-Cladaras M, Kirkland JL. Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001; 280: R1772–R1780.
- [275] Cartwright MJ, Tchkonja T, Kirkland JL. Aging in adipocytes: Potential impact of inherent, depot-specific mechanisms. *Exp Gerontol*, 2007; 42: 463–471.
- [276] Kim JY, Kim DH, Choi J, Park JK, Jeong KS, Leeuwenburgh C, Yu BP, Chung HY. Changes in lipid distribution during aging and its modulation by calorie restriction. *Age*, 2009; 31(2): 127-42.
- [277] Leibowitz KL, Chang G-Q, Pamy PS, Hill JO, Gayles EC, Leibowitz SF. Weight gain model in prepubertal rats: prediction and phenotyping of obesity-prone animals at normal body weight. *Int J Obes*, 2007; 31(8): 1210-21.
- [278] Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. Insulin and leptin as adiposity signals. *Recent Prog Horm Res*, 2004; 59: 267-285.
- [279] Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, and Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001; 280: E827-E847.
- [280] Ahima RS. Leptin signaling. *Physiol Behav*, 2004; 2: 223-241.

- [281] Martin-Gronet MS & Ozanne SE. Early life programming of obesity. *Med Wieku Rozwoj*. 2013; 17(1): 7-12.
- [282] Thong FSL & Graham TE. Leptin and reproduction: Is it a critical link between adipose tissue, nutrition and reproduction? *Canad J Appl Physiol*, 1999 ; 24: 317-336.
- [283] Balcombe JP, Barnard ND, Sandusky C. Laboratory routines cause animal stress. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 2004; 43(6): 42-51.
- [284] Pinilla L, Seoane LM, Gonzalez L, Carro E, Aguilar E, Casanueva FF, Dieguez C. Regulation of serum leptin levels by gonadal function in rats. *Eur J Endocrinol*, 1999; 140(5): 468-73.
- [285] Baile CA, Della-Fera MA, Martin RJ. Regulation of metabolism and body fat mass by leptin. *Annu Rev Nutr*, 2000; 20: 105-127.
- [286] Plagemann A, Roepke K, Harder T, Brunn M, Harder A, Wittrock-Staar M, Ziska T, Schellong K, Rodekamp E, Melchior K, Dudenhausen JW. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. *J Perinat Med*, 2010; 38: 393–400.
- [287] Figlewicz DP. Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol*, 2003; 284: R882-R892.
- [288] Imbeault P, Vidal H, Tremblay A, Vega N, Nadeau A, Despres JP, Mauriege P. Age-related differences in messenger ribonucleic acid expression of key proteins involved in adipose cell differentiation and metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86(2): 828-33.
- [289] Unger RH, Zhou YT, Orci L. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96: 2327–2332.
- [290] Wang ZW, Pan WT, Lee Y, Kakuma T, Zhou YT, Unger RH. The role of leptin resistance in the lipid abnormalities of aging. *FASEB J*, 2001; 15: 108–114.
- [291] Baumgartner RN, Heymsfield SB, Roche AF. Human body composition and the epidemiology of chronic disease. *Obes Res*, 1995; 3: 73–95.
- [292] Horber FF, Gruber B, Thomi F, Jensen EX, Jaeger P. Effect of sex and age on bone mass, body composition and fuel metabolism in humans. *Nutrition*, 1997; 13: 524–534.
- [293] Burton KA, Kabigting EB, Steiner RA, Clifton DK. Growth hormone (GH) receptor gene expression in the hypothalamus is increased during puberty. *Pediatr Res*, 1993; 33: S32–S32.
- [294] Eden S. Age-and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinol*, 1979; 105: 555-60.
- [295] Mode A, Gustafsson JA, Jansson JO. Association of plasma level of growth hormone and sex differentiation of hepatic steroid metabolism in the rat. *Endocrinol*, 1982; 111: 1692-7.
- [296] Norstedt G, Palmiter R. Secretory rhythm of growth hormone regulates sexual differentiation of mouse liver. *Cell*, 1984; 36: 805-12.
- [297] Clark RG, Jansson JO, Isaksson O. Intravenous growth hormone: growth responses to pattern infusions in hypophysectomized rats. *J Endocrinol*, 1985; 104: 53-61.

- [298] Chowen JA, Argente J, González-Parra S, García-Segura LM. Differential effects of the neonatal and adult sex steroid environments on the organization and activation of hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin neurons. *Endocrinology*, 1993; 133(6): 2792-802.
- [299] González-Parra S, Argente J, García-Segura LM, Chowen JA. Effect of neonatal and adult testosterone treatment on the cellular composition of the adult female rat anterior pituitary. *J Endocrinol*, 2000;164(3): 265-76.
- [300] Smith JT, Waddell BJ. Developmental changes in plasma leptin and hypothalamic leptin receptor expression in the rat: peripubertal changes and the emergence of sex differences. *J Endocrinol*, 2003; 176(3): 313-9.
- [301] Saleri R, Giustina A, Tamanini C. Leptin stimulates growth hormone secretion *via* a direct pituitary effect combined with a decreased somatostatin tone in a median eminence-pituitary perfusion study. *Neuroendocrinology*, 2004; 79: 221-8.
- [302] Ostlund RE, Yang JW, Klein S. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996; 81: 3909-13.
- [303] Han ES, Evans TR, Lee S, Nelson JF. Food restriction differentially affects pituitary hormone mRNAs throughout the adult life span of male F344 rats. *J Nutr*, 2001; 131(6): 1687-93.
- [304] Muller EE, Cella SG, DeGennaro Colonna V. Aspects of the neuroendocrine control of growth hormone secretion in aging mammals. *J Reprod Fertil Suppl*, 1993; 46: 99-114.
- [305] Veldhuis J. Aging and hormones of the hypothalamo-pituitary axis: Gonadotropic axis in men and somatotropic axes in men and women. *Ageing Res Rev*, 2008; 7: 189-208.
- [306] Marassi MP, Fortunato RS, da Silva ACM, Pereira VS, Carvalho DP, Rosenthal D, da Costa VMC. Sexual dimorphism in thyroid function and type 1 iodothyronine deiodinase activity in pre-pubertal and adult rats. *J Endocrinol*, 2007; 192: 121–130.
- [307] Banu SK & Aruldas MM. Sex steroids regulate TSH-induced thyroid growth during sexual maturation in Wistar rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2002; 110: 37–42.
- [308] Unger RH & Orci L. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim Biophys Acta*, 2002; 1585: 202–212.
- [309] Wang MY, Orci L, Ravazzola M, Unger RH. Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102(50): 18011-18016.
- [310] Kirk SL, Samuelsson AM, Argenton M. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS One*, 2009; 4: e5870.
- [311] Tannenbaum GS, Lapointe M, Gurd W. Mechanisms of impaired growth hormone secretion in genetically obese Zucker rats: Roles of growth hormone releasing factor and somatostatin. *Endocrinol*, 1990; 127: 3087-95.
- [312] Veldhuis JD, Iranmanesh A, Ho KKY. Dual effects in pulsatile growth hormone secretion and clearance subserve the hyposomatotropism of obesity in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991; 72: 51-9.

- [313] Ortiga-Carvalho TM, Oliveira KJ, Soares BA, Pazos-Moura CC. The role of leptin in the regulation of TSH secretion in the fed state: *in vivo* and *in vitro* studies. *J Endocrinol*, 2002; 174(1): 121-5.
- [314] Ostlund RE, Yang JW, Klein S. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996; 81: 3909-13.
- [315] Garcia-Segura LM, Lorenz B, DonCarlos LL. The role of glia in the hypothalamus: implications for gonadal steroid feedback and reproductive neuroendocrine output. *Reproduction*, 2008; 135(4): 419-29.
- [316] Garcia-Segura LM & Melcangi RC. Steroids and glial cell function. *Glia*, 2006; 54: 485–498.
- [317] Foecking EM, Szabo M, Schwartz NB, Levine JE. Neuroendocrine consequences of prenatal androgen exposure in the female rat: absence of luteinizing hormone surges, suppression of progesterone receptor gene expression, and acceleration of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator. *Biol Reprod*, 2005; 72: 1475–1483.
- [318] Sullivan SD & Moenter SM. Prenatal androgens alter GABAergic drive to gonadotropin-releasing hormone neurons: implications for a common fertility disorder. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 7129–7134.
- [319] Kim SJ, Foster DL, Wood RI. Prenatal testosterone masculinizes synaptic input to gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Biol Reprod*, 1999; 61: 599–605.
- [320] Han SK, Abraham IM, Herbison AE. Effect of GABA on GnRH neurons switches from depolarization to hyperpolarization at puberty in the female mouse. *Endocrinology*, 2002; 143: 1459–1466.
- [321] Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102: 2129–2134.
- [322] Cottrell EC, Campbell RE, Han SK, Herbison AE. Postnatal remodeling of dendritic structure and spine density in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 2006; 147: 3652–3661.
- [323] Horvath TL. Synaptic plasticity in energy balance regulation. *Obesity*, 2006; 14(5): 228S–233S.
- [324] Gao Q, Mezei G, Nie Y, Rao Y, Choi CS, Bechmann I, Leranath C, Toran-Allerand D, Priest CA, Roberts JL, *et al.* Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat Med*, 2007; 13: 89–94.
- [325] Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science*, 2004; 304: 110–115.
- [326] Bouret SG, Bates SH, Chen S, Myers MG, Simerly MB. Distinct roles for specific leptin receptor signals in the development of hypothalamic feeding circuits. *J Neurosci*, 2012; 32(4): 1244–1252.
- [327] Chowen JA, Busiguina S, Garcia-Segura LM. Sexual dimorphism and sex steroid modulation of glial fibrillary acidic protein messenger RNA and immunoreactivity levels in the rat hypothalamus. *Neuroscience*, 1995; 69: 519–532.

- [328] Horvath TL, Garcia-Segura LM, Naftolin F. Lack of gonadotropin-positive feedback in the male rat is associated with lack of estrogen-induced synaptic plasticity in the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology*, 1997; 65: 136–140.
- [329] Csakvari E, Hoyk Z, Gyenes A, Garcia-Ovejero D, Garcia-Segura LM, Parducz A. Fluctuation of synapse density in the arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neuroscience*, 2007; 144: 1288–1292.
- [330] Dugger BN, Morris JA, Jordan CL, Breedlove SM. Gonadal Steroids Regulate Neural Plasticity in the Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area of Adult Male and Female Rats. *Neuroendocrinology*, 2008; 88: 17–24.
- [331] Garcia-Segura LM, Duenas M, Busiguina S, Naftolin F, Chowen JA. Gonadal hormone regulation of neuronal-glia interactions in the developing neuroendocrine hypothalamus. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1995; 53: 293–298.
- [332] Mong JA, Glaser E, McCarthy MM. Gonadal steroids promote glial differentiation and alter neuronal morphology in the developing hypothalamus in a regionally specific manner. *J Neurosci*, 1999; 19: 1464–1472.
- [333] Mong JA & McCarthy MM. Steroid-induced developmental plasticity in hypothalamic astrocytes: implications for synaptic patterning. *J Neurobiol*, 1999; 40: 602–619.
- [334] Ojeda SR, Jameson HE, McCann SM. Developmental changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in the female rat: ovarian-adrenal influence during infantile period. *Endocrinology*, 1977; 100: 440-451.
- [335] Ojeda SR & Urbanski HE. Puberty in the rat. *The Physiology of Reproduction*, 2nd Ed. New York: Raven Press Ltd., 1992; 363-409.
- [336] Dohler KD, Wuttke W. Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology*, 1974; 97: 898-907.
- [337] Ojeda SR, Ramirez VD. Plasma levels of LH and FSH in maturing rats: response to hemigonadectomy. *Endocrinology*, 1972; 90: 466-472.
- [338] Wilson ME & Handa RJ. Gonadotropin secretion in infantile rats exposed to ethanol in utero. *Alcohol*, 1997; 14(5): 497-501.
- [339] Meijjs-Roelofs HM & Kramer P. Maturation of the inhibitory feedback action of oestrogen on follicle stimulating hormone secretion in the immature female rat: a role for alpha-fetoprotein. *J Endocrinol*, 1979; 81: 199-208.
- [340] Rivier C & Vale W. Inhibin measurement and role in the immature female rat. *Endocrinology*, 1987; 120: 1688-1690.
- [341] Cooper RL, Conn PM, Walker RF. Characterization of the LH surge in middle-aged female rats. *Biol Reprod*, 1980; 23: 611–615.
- [342] Ruwanpura SM, McLachlan RI, Stanton PG, Loveland KL, Meachem SJ. Pathways involved in testicular germ cell apoptosis in immature rats after FSH suppression. *J Endocrinol*, 2008; 197(1): 35-43.
- [343] Scarbrough K & Wise PM. Age-related changes in pulsatile luteinizing hormone release precede the transition to estrous acyclicity and depend upon estrous cycle history. *Endocrinology*, 1990; 126: 884–890.

- [344] Lederman MA, Lebesgue D, Gonzalez VV, Shu J, Merhi ZO, Etgen AM, Neal-Perry G. Age-related LH surge dysfunction correlates with reduced responsiveness of hypothalamic anteroventral periventricular nucleus kisspeptin neurons to estradiol positive feedback in middle-aged rats. *Neuropharmacology*, 2010; 58(1): 314–320.
- [345] Ghanadian R, Lewis JG, Chisholm GD. Serum testosterone and dihydrotestosterone changes with age in rat. *Steroids*, 1975; 25(6): 753–762
- [346] Swerdloff RS, Wang C, Bhasin S. Developments in the control of testicular function. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 1992; 6(2): 451–83.
- [347] Cashion AB, Smith MJ, Wise PM. The morphometry of astrocytes in the rostral preoptic area exhibits a diurnal rhythm on proestrus: relationship to the luteinizing hormone surge and effects of age. *Endocrinology*, 2003; 144: 274–280.
- [348] King JC & Letourneau RL. Luteinizing hormone-releasing hormone terminals in the median eminence of rats undergo dramatic changes after gonadectomy, as revealed by electron microscopic image analysis. *Endocrinology*, 1994; 134: 1340–1351.
- [349] Prevot V, CroixD, Bouret S, Dutoit S, TramuG, Stefano GB, Beauvillain JC. Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro–glio–endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience*, 1999; 94: 809–819.
- [350] Fernandez-Galaz MC, Martinez Munoz R, Villanua MA, Garcia-Segura LM. Diurnal oscillation in glial fibrillary acidic protein in a perisuprachiasmatic area and its relationship to the luteinizing hormone surge in the female rat. *Neuroendocrinology*, 1999; 70: 368–376.
- [351] Parducz A, Hoyk Z, Kis Z, Garcia-Segura LM. Hormonal enhancement of neuronal firing is linked to structural remodelling of excitatory and inhibitory synapses. *Eur J Neurosci*, 2002; 16: 665–670.
- [352] Parducz A, Zsarnovszky A, Naftolin F, Horvath TL. Estradiol affects axo-somatic contacts of neuroendocrine cells in the arcuate nucleus of adult rats. *Neuroscience*, 2003; 117: 791–794.
- [353] Castellano JM, Bentsen AH, Sánchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Romero M, Garcia-Galiano D, Aguilar E, Pinilla L, Diéguez C, Mikkelsen JD, Tena-Sempere M. Early metabolic programming of puberty onset: impact of changes in postnatal feeding and rearing conditions on the timing of puberty and development of the hypothalamic kisspeptin system. *Endocrinology*, 2011; 152(9): 3396-408.
- [354] Sánchez-Garrido MA, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Garcia-Galiano D, Manfredi-Lozano M, Leon S, Romero-Ruiz A, Diéguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Metabolic programming of puberty: Sexually dimorphic responses to early nutritional challenges. *Endocrinology*, 2013; 154(9): 3387-400.
- [355] Marín-Vivens CL, Olster DH. Abnormal Estrous Cyclicity and Behavioral Hyporesponsiveness to Ovarian Hormones in Genetically Obese Zucker Female Rats. *Endocrinology*. 1997; 138(1):143-8.
- [356] Fernández CDB, Bellentani FF, Fernández GSA, Perobelli JE, Favareto APA, Nascimento AF, Cicogna AC, Kempinas WDG. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011; 9: 32.

- [357] Granado M, García-Cáceres C, Fuente-Martín E, Díaz F, Mela V, Viveros MP, Argente J, Chowen JA. Effects of acute changes in neonatal leptin levels on food intake and long-term metabolic profiles in rats. *Endocrinology*, 2011; 152(11): 4116-26.
- [358] Aggarwal BB, Kunnnumakkara AB, Harikumar KB, Gupta SR, Tharakan ST, Koca C, Dey S, Sung B. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation and cancer. How Intimate Is the Relationship? *Ann NY Acad Sci*, 2009; 1171: 59–76.
- [359] Jain N, Zhang T, Kee WH, Li W, Cao X. Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner. *J Biol Chem*, 1999; 274: 24392–24400.
- [360] Fu AK, Fu WY, Ng AK, Chien WW, Ng YP, Wang JH, Ip NY. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and regulates its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 6728–6733.
- [361] Yokogami K, Wakisaka S, Avruch J, Reeves SA. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol*, 2000; 10: 47–50.
- [362] Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, 1997; 278: 1803–1805.
- [363] Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, Chin YE. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science*, 2005; 307: 269–273.
- [364] Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzameli I, Bjorbaek C. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat Med*, 2004; 10: 734–738.
- [365] Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat Med*, 2004; 10: 739–743.
- [366] Kievit P, Howard JK, Badman MK, Balthasar N, Coppari R. Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells. *Cell Metab*, 2006; 4: 123–132.
- [367] Ernst MB, Wunderlich CM, Hess S, Paehler M, Mesaros A. Enhanced Stat3 activation in POMC neurons provokes negative feedback inhibition of leptin and insulin signaling in obesity. *J Neurosci*, 2009; 29: 11582–11593.
- [368] Trevenzoli IH, Rodrigues AL, Oliveira E, Thole AA, Carvalho L, Figueiredo MS, Toste FP, Neto JF, Passos MC, Lisboa PC, Moura EG. Leptin treatment during lactation programs leptin synthesis, intermediate metabolism, and liver microsteatosis in adult rats. *Horm Metab Res*, 2010; 42(7): 483-90.
- [369] Passos MC, Toste FP, Dutra SC, Trotta PA, Toste FP, Lisboa PC, de Moura EG. Role of neonatal hyperleptinaemia on serum adiponectin and suppressor of cytokine signalling-3 expression in young rats. *Br J Nutr*, 2009; 101: 250-256.
- [370] Trotta PA, Moura EG, Franco JG, Lima NS, de Oliveira E, Cordeiro A, Souza LL, Oliveira KJ, Lisboa PC, Pazos Moura CC, Passos MC. Blocking leptin action one week after weaning reverts most of the programming caused by neonatal hyperleptinemia in the adult rat. *Horm Metab Res*, 2011; 43(3): 171-7.

- [371] Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science*, 2004; 304: 108-110.
- [372] Mistry A, Swick A, Romsos D. Leptin alters metabolic rates before acquisition of its anorectic effect in developing neonatal mice. *Am J Physiol*, 1999; 277: R742-7.
- [373] Ahima RS, Hileman SM. Postnatal regulation of hypothalamic neuropeptide expression by leptin: implications for energy balance and body weight regulation. *Regul Pept*, 2000; 92(1-3): 1-7.
- [374] de Backer MWA, Brans MA, van Rozen AJ, van der Zwaal EM, Luijendijk MC, Garner KG, de Krom M, van Beekum O, la Fleur SE, Adan RA. Suppressor of cytokine signaling 3 knockdown in the mediobasal hypothalamus: counterintuitive effects on energy balance. *J Mol Endocrinol*, 2010; 45(5): 341-53.
- [375] Lagues-Rodrigues A, de Moura EG, Passos MC, Trevenzoli IH, da Conceição EP, Bonono IT, Neto JF, Lisboa PC. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *J Nutr Biochem*, 2011; 22(2): 109-17.
- [376] Hill RA, Margetic S, Pegg GG, Gazzola C. Leptin: its pharmacokinetics and tissue distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1998; 22(8): 765-70.
- [377] Cumin F, Baum HP, Levens N. Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1996; 20(12): 1120-6.
- [378] Hill JW, Williams KW, Ye C, Luo J, Balthasar N, Coppari R, Cowley MA, Cantley LC, Lowell BB, Elmquist JK. Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *J Clin Invest*, 2008; 118: 1796–1805.
- [379] Myers MG Jr, Leibel RL, Seeley RJ, Schwartz MW. Obesity and Leptin Resistance: Distinguishing Cause from Effect. *Trends Endocrinol Metab*, 2010; 21(11): 643–651.
- [380] Faouzi M, Leshan R, Bjornholm M, Hennessey T, Jones J, Munzberg H. Differential accessibility of circulating leptin to individual hypothalamic sites. *Endocrinology*, 2007; 148: 5414–5423.
- [381] Robertson SA, Leininger GM, Myers MG Jr. Molecular and neural mediators of leptin action. *Physiol Behav*, 2008; 94(5): 637-42.
- [382] Plum L, Rother E, Munzberg H, Wunderlich FT, Morgan DA, Hampel B, Shanabrough M, Janoschek R, Konner AC, Alber J, Suzuki A, Krone W, Horvath TL, Rahmouni K, Bruning JC. Enhanced leptin-stimulated Pi3k activation in the CNS promotes white adipose tissue transdifferentiation. *Cell Metab*, 2007; 6: 431–445.
- [383] Trinko R, Gan G, Gao XB, Sears RM, Guarnieri DJ, DiLeone RJ. Erk1/2 mediates leptin receptor signaling in the ventral tegmental area. *PLoS One*, 2011; 6(11): e27180.
- [384] Herrid M, Xia Y, O'Shea T, McFarlane JR. Leptin inhibits basal but not gonadotrophin-stimulated testosterone production in the immature mouse and sheep testis. *Reprod Fertil Dev*, 2008; 20(4): 519-28.
- [385] Wang N, Luo LL, Xu JJ, Xu MY, Zhang XM, Zhou XL, Liu WJ, Fu YC. Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats. *Metabolism*, 2014; 63(1): 94-103.

- [386] Horovitz O, Tsoory MM, Hall J, Jacobson-Pick S, Richter-Levin G. Post-weaning to pre-pubertal ('juvenile') stress: a model of induced predisposition to stress-related disorders. *Neuroendocrinology*, 2012; 95(1): 56-64.
- [387] Knight ZA, Hannan KS, Greenberg ML, Friedman JM. Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance. *PLoS One*, 2010; 5(6): 11376.
- [388] Tena-Sempere M, Pinilla L, González LC, Diéguez C, Casanueva FF, Aguilar E. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *J Endocrinol*, 1999; 161(2): 211-8.
- [389] Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang FP, Pinilla L, González LC, Diéguez C, Huhtaniemi I, Aguilar E. Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. *J Endocrinol*, 2001; 170(2): 413-23.
- [390] Zhao AZ, Huan JN, Gupta S, Pal R, Sahu A. A phosphatidylinositol 3-kinase phosphodiesterase 3B-cyclic AMP pathway in hypothalamic action of leptin on feeding. *Nat Neurosci*, 2002; 5(8): 727-8.
- [391] Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*, 2012; 4(9): 429-34.
- [392] Jiang L, Li Z, Rui L. Leptin stimulates both JAK2-dependent and JAK2-independent signaling pathways. *J Biol Chem*, 2008; 283(42): 28066-73.
- [393] Yu WH, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland. *Endocrinology*, 1997; 138(11): 5055-8.
- [394] Ogura K, Irahara M, Kiyokawa M, Tezuka M, Matsuzaki T, Yasui T, Kamada M, Aono T. Effects of leptin on secretion of LH and FSH from primary cultured female rat pituitary cells. *Eur J Endocrinol*, 2001; 144(6): 653-8.
- [395] Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science*, 2005; 310: 679-683.
- [396] Unger TJ, Calderon GA, Bradley LC, Sena-Esteves M, Rios M. Selective Deletion of *Bdnf* in the Ventromedial and Dorsomedial Hypothalamus of Adult Mice Results in Hyperphagic Behavior and Obesity. *J Neurosci*, 2007; 27(52): 14265-14274.
- [397] Lebrun B, Bariohay B, Moyse E, Jean A. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and food intake regulation: a minireview. *Auton Neurosci*, 2006; 126-127: 30-38.
- [398] Noble EE, Billington CJ, Kotz CM, Wang C. The lighter side of BDNF. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011; 300: 1053-1069.
- [399] Beckers S, Peeters A, Zegers D, Mertens I, Van Gaal L, Van Hul W. Association of the BDNF Val66Met variation with obesity in women. *Mol Genet Metab*, 2008; 95: 110-112.
- [400] Burns B, Schmidt K, Williams SR, Kim S, Girirajan S, Elsea SH. Rai1 haploinsufficiency causes reduced *Bdnf* expression resulting in hyperphagia, obesity and altered fat distribution in mice and humans with no evidence of metabolic syndrome. *Hum Mol Genet*, 2010; 19: 4026-4042.

- [401] Fox EA, Byerly MS. A mechanism underlying mature-onset obesity: evidence from the hyperphagic phenotype of brain-derived neurotrophic factor mutants. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004; 286: 994–1004.
- [402] Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, Lechan RM, Jaenisch R. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol*, 2001; 15: 1748–1757.
- [403] Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci*, 2003; 6: 736–742.
- [404] Bariohay B, Lebrun B, Moyse E, Jean A. Brain-derived neurotrophic factor plays a role as an anorexigenic factor in the dorsal vagal complex. *Endocrinology*, 2005; 146: 5612–5620.
- [405] Bariohay B, Roux J, Tardivel C, Trouslard J, Jean A, Lebrun B. Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase receptor type B signaling is a downstream effector of the brainstem melanocortin system in food intake control. *Endocrinology*, 2009; 150: 2646–2653.
- [406] Spaeth AM, Kanoski SE, Hayes MR, Gril HJ. TrkB receptor signaling in the nucleus tractus solitarius mediates the food intake-suppressive effects of hindbrain BDNF and leptin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012; 302: 1252–1260.
- [407] Nakagawa T, Tsuchida A, Itakura Y, Nonomura T, Ono M, Hirota F, Inoue T, Nakayama C, Taiji M, Noguchi H. Brain-derived neurotrophic factor regulates glucose metabolism by modulating energy balance in diabetic mice. *Diabetes*, 2000; 49: 436–444.
- [408] Tsao D, Thomsen HK, Chou J, Stratton J, Hagen M, Loo C, Garcia C, Sloane DL, Rosenthal A, Lin JC. TrkB agonists ameliorate obesity and associated metabolic conditions in mice. *Endocrinology*, 2008; 149: 1038–1048.
- [409] Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol*, 2005; 192: 348–356.
- [410] Kozisek ME, Middlemas D, Bylund DB. The differential regulation of BDNF and TrkB levels in juvenile rats after four days of escitalipram and desipramine treatment. *Neuropharmacology*, 2008; 54: 251–257.
- [411] Li T, Jiang L, Zhang X, Chen H. In-vitro effects of brain-derived neurotrophic factor on neural progenitor/stem cells from rat hippocampus. *Neuroreport*, 2009; 20: 295–300.
- [412] Arai AC, Orwig N. Factors that regulate KiSS1 gene expression in the hippocampus. *Brain Res*, 2008; 1243: 10-8.
- [413] Gupta VK, You Y, Gupta VB, Klistorner A, Gram SL. TrkB receptor signalling: implications in neurodegenerative, psychiatric and proliferative disorders. *Int J Mol Sci*, 2013; 14: 10122-10142.
- [414] Moyse E, Bédard K, Segura S, Mahaut S, Tardivel C, Ferland G, Lebrun B, Gaudreau P. Effects of aging and caloric restriction on brainstem satiety center signals in rats. *Mech Ageing Dev*, 2012; 133: 83–91.