

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Facultad de Medicina
Departamento de Pediatría**



**IMPLICACIÓN DE LOS ASTROCITOS HIPOTALÁMICOS EN
LAS ALTERACIONES METABÓLICAS Y EN LOS CAMBIOS DE
COMPOSICIÓN CORPORAL INDUCIDOS POR MALNUTRICIÓN
EN LOS PERIODOS NEONATAL Y ADULTO:
NUEVAS ACCIONES DE LA LEPTINA Y LA GHRELINA**

Memoria para optar al grado de doctor de la licenciada

ESTHER DE LA FUENTE MARTÍN

DIRECTORES:

**Prof. Dr. Jesús Argente Oliver
Dra. Julie Ann Chowen King**

Madrid, 2011

RESUMEN

Estudios recientes sugieren que la nutrición perinatal produce efectos a largo plazo en el crecimiento y desarrollo, alterando la respuesta a cambios metabólicos posteriores. El hipotálamo es un elemento clave en la regulación del metabolismo energético y puede verse alterado por el ambiente fetal y neonatal, encontrándose afectadas tanto las neuronas como las células gliales. Los astrocitos hipotalámicos están implicados en diversas funciones, entre ellas el transporte, la detección y el metabolismo de glucosa y glutamato, y es muy probable que ejerzan un papel importante en la adaptación a nuevas situaciones metabólicas, tanto durante el desarrollo como en el adulto.

El objetivo de la tesis fue determinar si el metabolismo periférico queda alterado de la misma manera en machos y hembras como resultado de la mala nutrición neonatal y de una dieta rica en sacarosa en la etapa adulta. Igualmente, comprender cómo se afectan los astrocitos y los transportadores de glucosa y glutamato hipotalámicos por efecto de la sobrenutrición neonatal, de una dieta rica en sacarosa y en respuesta a dos señales metabólicas fundamentales como son la leptina y la ghrelina.

Para ello se utilizó un modelo en rata en el que se indujeron cambios en la ingesta neonatal y en el que se introdujo una dieta rica en sacarosa en diversos períodos para analizar el metabolismo periférico y las alteraciones de la morfología y de los transportadores de glucosa y glutamato de los astrocitos hipotalámicos. Estos parámetros se analizaron también en respuesta a la leptina y la ghrelina en ratas adultas e *in vitro*.

Los resultados obtenidos indican que ambos sexos responden de forma diferente en su ganancia de peso a una sobrenutrición o a una malnutrición neonatal, tanto cuando siguen una dieta normal como en respuesta a una dieta rica en carbohidratos. Además, los cambios metabólicos en los machos se asocian con modificaciones en proteínas estructurales de la glía, en el número de astrocitos y en los transportadores de glucosa y de glutamato en el hipotálamo. Algunos de estos cambios pueden ser debidos a los efectos directos de la leptina o de la ghrelina.

Por tanto, las condiciones nutricionales tempranas producen efectos metabólicos sexualmente dimórficos. Además, en machos, la sobrenutrición neonatal condiciona la respuesta a posteriores modificaciones en la dieta y ejerce efectos permanentes en el hipotálamo en desarrollo, induciendo cambios en el transporte de glucosa y de glutamato por parte de los astrocitos. Este estudio indica la implicación de los cambios gliales en la adaptación a nuevas situaciones metabólicas, abriendo nuevas opciones de dianas para el desarrollo de fármacos contra la obesidad.

PALABRAS CLAVE: hipotálamo; glía; ghrelina; leptina; transportadores de glucosa y de glutamato.

ABREVIATURAS

ABC: Avidina-biotina peroxidada.	g: Gramos.
ADN: Ácido desoxirribonucleico.	GA: Ghrelina acilada.
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.	GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.
AgRP: Péptido relacionado con la proteína agoutí.	GFAP: Proteína ácida fibrilar de glía.
AMPc: Adenosín 3',5'-monofosfato cíclico.	GFAP⁺: Inmunoreactividad para la proteína ácida fibrilar de glía.
AMPK: 5'-adenosín monofosfato quinasa.	GH: Hormona de crecimiento.
ANOVA: Análisis de la varianza.	GHS: Secretagogo de la hormona de crecimiento.
ApoE: Apolipoproteína E.	GHS-R: Receptor de los secretagogos de la hormona de crecimiento.
ARC: Núcleo arcuato del hipotálamo.	GHS-R1a: Receptor de los secretagogos de la hormona de crecimiento tipo 1a.
ARN: Ácido ribonucleico.	GHS-R1b: Receptor de los secretagogos de la hormona de crecimiento tipo 1b.
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.	GLAST: Transportador de glutamato-aspartato.
ATP: Adenosina trifosfato.	Gln: Glutamina.
BHE: Barrera hematoencefálica.	GLT-1: Transportador de glutamato 1.
BSA: Albumina sérica bovina.	GLUTs: Transportadores de glucosa.
C6: Línea de astrocitoma de rata.	GOAT: Ghrelina-O-aciltransferasa.
CART: Tránsito regulado por cocaína y amfetamina.	GHRL: Gen de la ghrelina.
CM: Crías por madre.	GS: Glutamina sintetasa.
cm³: Centímetros cúbicos.	GSC: Grasa subcutánea.
DAB: Diaminobencidina.	GT: Ghrelina total.
DE: Desviación estándar.	GV: Grasa visceral.
Depex: Medio de montaje para microscopía.	H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.
DMEM: Medio Dulbecco modificado por Eagle.	HCl: Ácido clorhídrico.
DMN: Núcleo dorsomedial del hipotálamo.	HDL: Lipoproteína de alta densidad.
EAAT: Transportador de aminoácidos excitadores.	HRP: Peroxidasa de rábano.
EDTA: Ácido tilendiaminotetraacético.	icv: Intracerebroventricular.
e.e.m.: Error estándar de la media.	IgG: Anti-inmunoglobulina G.
FBS: Suero fetal bovino.	IMC: Índice de masa corporal.
	JAK: <i>Janus</i> quinasa.
	K⁺: Ión potasio.

Kcal: Kilocalorías.	PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación.
KDa: Kilodaltons.	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
kg: Kilogramos.	PFA: Paraformaldehído.
Lac: Lactato.	pg: Picogramos.
LDL: Lipoproteína de baja densidad.	PGK1: Fosfoglicerato quinasa 1.
M: Molar.	pH: Potencial de hidrógeno.
m²: Metros cuadrados.	PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
mA: Miliamperios.	PND: Día postnatal.
MC3/4-R: Receptores de melanocortinas.	POMC: Proopiomelanocortina.
ml: Mililitros.	PVDF: Difluoruro de polivinilo.
mm: Milímetros.	PVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo.
mm²: Milímetros cuadrados.	Pyr: Piruvato.
MSH: Hormona estimuladora de melanocitos.	RCA-6: Línea de neuronas hipotalámicas fetales.
Na⁺: Ión sodio.	RIA: Radioinmunoensayo.
NaCl: Cloruro sódico.	rpm: revoluciones por minuto.
NEFA: Ácidos grasos libres no esterificados.	RPMI: Medio de cultivo (Roswell Park Memorial Institute médium).
ng: Nanogramos.	RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.
NGS: Suero de cabra.	SDS: Dodecil sulfato sódico.
nm: Nanómetros.	SNC: Sistema nervioso central.
NPY: Neuropeptido Y.	STAT: Transductor de señales y activador de la transcripción.
VMN: Núcleo ventromedial del hipotálamo.	WB: <i>Western blotting</i> .
ob/ob: Ratones deficientes de leptina.	Y-R: Receptor de neuropeptido Y.
Ob-R: Receptor de leptina.	µg: Microgramos.
°C: Grados centígrados.	µl: Microlitros.
OCT: Compuesto para el corte a temperatura óptima.	µm: Micras.
OMS: Organización Mundial de la Salud.	
p100: Placas de 100 x 20 milímetros.	
p60: Placas de 60 x 15 milímetros.	
PAGE: Gel de poliacrilamida.	
PB: Tampón fosfato.	
PBS: Tampón fosfato salino.	

Grupos experimentales:

12CM: 12 crías por madre durante la lactancia. Dieta normal. Grupo control.

12CMS: 12 crías por madre durante la lactancia. Dieta rica en sacarosa.

4CM: 4 crías por madre durante la lactancia. Dieta normal.

4CMS: 4 crías por madre durante la lactancia. Dieta rica en sacarosa.

20CM: 20 crías por madre durante la lactancia. Dieta normal.

20CMS: 20 crías por madre durante la lactancia. Dieta rica en sacarosa.

Ct: Grupo control.

Ayuno 12h: Grupo sacrificado tras un ayuno de 12 horas.

Ayuno 24h: Grupo sacrificado tras un ayuno de 24 horas.

G: Grupo Ghrelina.

G pair-fed: Grupo ghrelina pair-fed.

L: Leptina.

Ct0: Grupo control tiempo 0.

Ct24h: Grupo control 24 horas.

G24h: Grupo ghrelina 24 horas.

L24h: Grupo leptina 24 horas.

ÍNDICE

I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. LA OBESIDAD	1
1.1. Efecto de la nutrición prenatal y neonatal sobre la obesidad	2
1.2. Efecto del tipo de dieta sobre la obesidad	4
2. CONTROL METABÓLICO	6
2.1. El hipotálamo	6
2.1.1. Anatomía del hipotálamo	7
2.1.2. Funciones del hipotálamo	9
2.1.3. El núcleo arcuato del hipotálamo	9
2.2. Los astrocitos y el control metabólico	12
3. GLUCOSA Y TRANSPORTADORES DE GLUCOSA	15
3.1. Transportadores de glucosa	16
3.1.1. Transportador de glucosa GLUT-1.....	19
3.1.2. Transportador de glucosa GLUT-2.....	20
3.1.3. Transportador de glucosa GLUT-3.....	21
3.2. Glucosa, células gliales y transportadores de glutamato	21
4. COMUNICACIÓN ENTRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y EL SISTEMA PERIFÉRICO	25
4.1. La leptina	26
4.1.1. Estructura de la leptina	27
4.1.2. El receptor de la leptina	27
4.1.3. Funciones de la leptina	28
4.2. La ghrelina.....	30
4.2.1. Estructura de la ghrelina	31
4.2.2. Los receptores de la ghrelina.....	32
4.2.3. Funciones de la ghrelina	33
II. <u>HIPÓTESIS</u>	36
III. <u>OBJETIVOS</u>	37
IV. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	38
1. MODELOS EXPERIMENTALES	38
1.1. Modelos de experimentación <i>in vivo</i>	38
1.1.1. Modificación del tamaño de camada durante el periodo de lactancia.....	38
1.1.1A. Efecto del sexo en la respuesta a la sobrenutrición y malnutrición neonatal y a una dieta rica en sacarosa	39
1.1.1B. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de una dieta rica en sacarosa en ratas macho 40	
1.1.1B1. Dieta rica en sacarosa 1: Dos semanas de dieta rica en sacarosa, desde el día postnatal 60 hasta el sacrificio (día postnatal 75).....	40
1.1.1B2. Dieta rica en sacarosa 2: Dos meses de dieta rica en sacarosa, desde el destete (día postnatal 21) hasta el sacrificio (día postnatal 75).....	41

1.1.2. Tratamiento central y crónico de ghrelina o leptina.....	43
1.1.3. Tratamiento central y agudo de ghrelina.....	44
1.1.4. Experimento de ayuno	45
1.2. Modelos de experimentación <i>in vitro</i>	46
1.2.1. Cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos	46
1.2.2. Cultivos de la línea celular RCA-6.....	48
1.2.3. Cultivo de la línea celular C6.....	49
2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES	50
2.1. Perfusión transcardial.....	50
2.2. Disección del hipotálamo	51
2.3. Análisis proteico.....	51
2.3.1. Obtención de la fracción proteica total	51
2.3.2. Separación de las proteínas de membrana en la línea celular C6.....	52
2.3.3. Cuantificación de la concentración de proteínas	53
2.3.4. <i>Western Blotting</i>	53
2.4. Análisis de los ARN mensajeros	55
2.4.1. Obtención y separación del ARN total	55
2.4.2. Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real	55
2.5. Obtención de las secciones de tejido	57
2.5.1. Secciones de cerebros perfundidos.....	57
2.5.2. Secciones de tejido adiposo visceral.....	57
2.6. Inmunohistoquímica para la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP) en el hipotálamo	57
2.7. Análisis cuantitativo y morfológico de las células GFAP ⁺ en el núcleo arcuato del hipotálamo	58
2.8. Doble inmunocitofluorescencia para GLUT-2 o GLAST y vimentina en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos	59
2.9. Análisis histológico del tejido adiposo visceral.....	60
2.10. Determinaciones bioquímicas en plasma.....	60
2.10.1. Radioinmunoensayo para la determinación de los niveles séricos de ghrelina total y acilada y corticosterona.....	60
2.10.2. ELISA para la determinación de los niveles séricos de insulina, leptina y adiponectina	62
2.10.3. Análisis colorimétrico para la detección de los niveles séricos de colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos, proteínas totales y ácidos grasos libres.....	63
2.11. Detección de los niveles de glutamato en medio de crecimiento de cultivos celulares.....	64
2.12. Estadística.....	65
V. RESULTADOS.....	66
1. EFECTO DEL SEXO EN LA RESPUESTA METABÓLICA ADULTA A LA MALA NUTRICIÓN NEONATAL.....	66
1.1. Efecto del tamaño de camada, del sexo y de una dieta rica en sacarosa en la ingesta de comida y bebida y en la ganancia de peso	66
1.2. Efecto del tamaño de camada, del sexo y de una dieta rica en sacarosa sobre los niveles séricos de hormonas metabólicas	72

2. EFECTO DE LA SOBRENUTRICIÓN NEONATAL EN LA RESPUESTA METABÓLICA A UNA DIETA RICA EN SACAROSA INTRODUCIDA EN LA ETAPA ADULTA O DESDE EL DESTETE.....	73
2.1. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre la ingesta de comida y bebida	73
2.2. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre el peso corporal y los depósitos de tejido adiposo y el músculo	75
2.3. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los niveles séricos de hormonas metabólicas	76
2.4. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los niveles séricos de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres y proteínas totales	77
2.5. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre la morfología de los adipocitos viscerales	78
2.6. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los neuropéptidos hipotalámicos implicados en la ingesta y el receptor de leptina.....	79
2.7. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 meses, desde el destete hasta el sacrificio, sobre la ingesta de comida y bebida.....	80
2.8. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 meses, desde el destete hasta el sacrificio, sobre el peso corporal y los depósitos de tejido adiposo y el músculo	81
2.9. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 meses, desde el destete hasta el sacrificio, sobre los niveles séricos de hormonas metabólicas	82
2.10. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 meses, desde el destete hasta el sacrificio, sobre los niveles séricos de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres y proteínas totales	84
2.11. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 meses, desde el destete hasta el sacrificio, sobre la morfología de los adipocitos viscerales	85
2.12. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 meses, desde el destete hasta el sacrificio, sobre los neuropéptidos implicados en la ingesta y el receptor de leptina.....	86
3. EFECTO DE LA SOBRENUTRICIÓN NEONATAL Y DE UNA DIETA RICA EN SACAROSA SOBRE LOS ASTROCITOS Y LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA Y DE GLUTAMATO HIPOTALÁMICOS	87
3.1. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre las proteínas estructurales del hipotálamo	87
3.2. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los transportadores de glucosa y de glutamato del hipotálamo	88
3.3. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 meses, desde el destete hasta el sacrificio, sobre proteínas estructurales del hipotálamo y sobre la morfología y número de los astrocitos hipotalámicos.....	90
3.4. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 meses, desde el destete hasta el sacrificio, sobre los transportadores de glucosa y de glutamato en el hipotálamo	92
4. EFECTO DE LA GHRLEINA Y DE LA LEPTINA SOBRE LOS ASTROCITOS Y LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA Y DE GLUTAMATO HIPOTALÁMICOS	94
4.1. Efecto del ayuno	95
4.1.1. Efecto del ayuno sobre los niveles séricos de hormonas metabólicas.....	95

4.1.2 Efecto del ayuno sobre las proteínas estructurales y los transportadores de glucosa y de glutamato hipotalámicos.....	95
4.2. Efecto de la exposición central y crónica de ghrelina	97
4.2.1. Efecto de la administración central y crónica de ghrelina sobre la ingesta, el peso corporal y los depósitos de grasa y músculo	97
4.2.2 Efecto de la administración central y crónica de ghrelina sobre los niveles séricos de hormonas metabólicas y sobre los neuropéptidos hipotalámicos implicados en la ingesta	98
4.2.3. Efecto de la administración central y crónica de ghrelina sobre las proteínas estructurales y sobre los transportadores de glucosa y de glutamato en el hipotálamo	99
4.3. Efecto de la exposición central y aguda de ghrelina	100
4.3.1. Efecto de la administración central y aguda de ghrelina sobre la ingesta, el peso corporal y los niveles séricos de hormonas metabólicas	100
4.3.2 Efecto de la administración central y aguda de ghrelina sobre las proteínas estructurales y sobre los transportadores de glucosa y de glutamato en el hipotálamo	101
4.4. Efecto de la ghrelina sobre los transportadores de glucosa en la línea neuronal RCA-6.....	102
4.5. Efecto de la ghrelina sobre los transportadores de glucosa y de glutamato en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos.....	103
4.6. Efecto de la ghrelina sobre el transportador de glucosa GLUT-2 y el transportador de glutamato GLAST en la línea celular de astrocitoma C6.....	105
4.7. Efecto de la exposición central y crónica de leptina	106
4.7.1. Efecto de la administración central y crónica de leptina sobre el peso corporal y los niveles séricos de hormonas metabólicas	106
4.7.2 Efecto de la administración central y crónica de leptina sobre las proteínas estructurales y sobre los transportadores de glucosa y de glutamato en el hipotálamo	106
4.8. Efecto de la leptina sobre los transportadores de glucosa en la línea neuronal RCA-6.....	107
4.9. Efecto de la leptina sobre los transportadores de glucosa y de glutamato en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos.....	108
4.10. Determinación de los niveles de glutamato liberado al medio en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos	109
4.11. Efecto de la leptina sobre el transportador de glucosa GLUT-2 y el transportador de glutamato GLAST en la línea celular de astrocitoma C6.....	110
VI. <u>DISCUSIÓN</u>	111
VII. <u>CONCLUSIONES</u>	148
VIII. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	149

I. INTRODUCCIÓN

1. La obesidad

En las últimas décadas se ha producido un incremento alarmante de la obesidad (Lu y cols., 2001; Frye y Heinrich, 2003), generando lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha dado en denominar “epidemia del siglo XXI”, asociando comorbilidades (diabetes mellitus tipo 2, dislipemias, alteraciones cardiovasculares, incremento de determinados procesos oncológicos, artritis, hiperuricemia, hipertransaminemia), así como alteraciones psicológicas (Horvath, 2005; Bray y cols., 2006; Despres, 2006; Mühlhäusler y cols., 2008; Argente, 2011; Martos-Moreno y Argente, 2011).

La OMS define la obesidad en el adulto como un índice de masa corporal (IMC) igual o superior a 30. El IMC 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 (kg/m^2). Por el contrario, la obesidad en el niño y adolescente se define en función del IMC expresado en percentiles o desviaciones estándar (DE). Aunque no hay un acuerdo internacional, podría hablarse de obesidad en la infancia y adolescencia cuando el IMC es superior al percentil P97 o superior a +2 DE (Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre la Prevención y el Tratamiento de la Obesidad Infantojuvenil, 2009).

La obesidad es el resultado de un balance positivo entre el consumo calórico y el gasto energético a lo largo del tiempo (Barrios y cols., 2007). Dicho balance se ve afectado por diversos factores genéticos, hormonales y nutricionales, así como por influencias ambientales y psicosociales (Argente y cols., 1997, Raj y Kumar, 2010). Aunque los genes desempeñan una función relevante en la regulación de la masa corporal, no es posible explicar la reciente aparición y el rápido aumento de la obesidad en el mundo occidental únicamente mediante cambios genéticos en la población; sin embargo, es necesario recordar la enorme progresión efectuada en nuestros conocimientos sobre mutaciones en al menos 20 genes, que cosegregan con el fenotipo de obesidad, así como los avances efectuados en las bases moleculares de múltiples entidades sindrómicas (Argente, 2011, Martos-Moreno y cols., 2011). Es más probable que la obesidad afecte a aquellos individuos genéticamente predispuestos expuestos a condiciones ambientales obesógenas, como una dieta hipercalórica y un marcado sedentarismo (Mendieta-Zerón y cols., 2007).

Por consiguiente, los cambios producidos en las últimas décadas en el estilo de vida y en el tipo de dieta en los países occidentales desempeñan un papel prioritario en el incremento del índice de obesidad en dichos países.

1.1. Efecto de la nutrición prenatal y neonatal sobre la obesidad

La nutrición prenatal y neonatal es un factor que puede tener efectos a largo plazo en el crecimiento y desarrollo, así como en la respuesta a cambios metabólicos posteriores en la edad adulta. Datos epidemiológicos y estudios experimentales en animales sugieren que cualquier estímulo que se produzca durante el desarrollo genera una respuesta fisiológica permanente (Lucas, 1998), por lo que las condiciones nutricionales fetales y neonatales tempranas producen efectos sobre el feto que persisten en etapas posteriores de la vida (Lucas, 1998). Esto se explica, en parte, porque los períodos tempranos de la vida corresponden en gran medida al período de la diferenciación neuronal y de la maduración del sistema nervioso central (SNC), por lo que la nutrición perinatal tiene una influencia crítica en el desarrollo y en la regulación de vías y redes involucradas en el crecimiento (Mendieta-Zerón y cols., 2007).

En la década de los 90, Barker y colaboradores presentaron la hipótesis conocida como *Hipótesis Barker*, según la cual la adiposidad abdominal, las enfermedades coronarias y otros factores asociados al síndrome metabólico podrían suceder como resultado de una nutrición materna pobre durante la gestación (Barker y cols., 1993; Barker, 1998). Por tanto, los cambios epigenéticos que se produzcan durante el desarrollo desempeñarían una función relevante sobre el crecimiento y la composición corporal de las crías durante el resto de su vida, (Levin, 2008; Symonds y cols., 2009), de manera que la obesidad podría deberse, en parte, a cambios epigenéticos producidos en etapas tempranas del desarrollo (Lillicrop y cols., 2008; Heijmans y cols., 2009).

Se ha observado que tanto la restricción calórica como la sobrenutrición durante la gestación predisponen a las crías al desarrollo de obesidad y al síndrome metabólico (Bellinger y col., 2006; Bayol y col., 2008; Chen y col., 2008). En mujeres embarazadas no obesas, se ha observado que una ganancia de peso excesiva durante el embarazo incrementa el riesgo de que los hijos desarrollen obesidad (Olson y cols., 2009; Stuebe y cols., 2009). Recientemente, se ha demostrado que el sobrepeso materno en ratas desde la

concepción hasta el nacimiento programa cambios sistémicos en los niveles de insulina y adiponectina en las crías y altera la expresión de genes implicados en el metabolismo de carbohidratos, en la biosíntesis lipídica y en el catabolismo de ácidos grasos (**Shankar y cols., 2010**).

Según afirmaron Hales y Barker, si la nutrición en el útero es pobre, lo que se produce por una malnutrición de la madre, en el feto se generan respuestas adaptativas para maximizar la ingesta y conservar los nutrientes disponibles, con lo que se genera un metabolismo ahorrador (**Hales y Barker, 1992**). Cuando las crías se exponen a dietas postnatales pobres o deficientes, como la que han recibido durante la gestación, los cambios generados durante el desarrollo les otorgan una ventaja adaptativa, están preparados para soportar esta dieta pobre. Sin embargo, las alteraciones que se generan cuando la dieta postnatal es adecuada o excesiva conducen al síndrome metabólico (**Gluckman y Hanson, 2004**).

El síndrome metabólico es definido clásicamente como la combinación de una serie de anomalías en un individuo que aumentan su probabilidad de padecer una enfermedad cardiovascular o diabetes mellitus: hipertensión arterial, adiposidad central, bajos niveles séricos de colesterol HDL, elevadas concentraciones séricas de triglicéridos e hiperglucemia en ayuno (**NHANES III, 1988-94**). Estudios posteriores han incluido diversos factores de inflamación y el estrés oxidativo como biomarcadores del síndrome metabólico (**Reilly y Rader, 2003**). Otros, han sugerido la inclusión de la resistencia a la leptina (**Arch y cols., 1998**) y la activación de células endoteliales (**Bonora y cols., 2003**).

Por tanto, una nutrición inadecuada durante estados importantes del desarrollo puede acentuar la respuesta a una sobrenutrición o a una malnutrición en etapas posteriores (**Boullu-Ciocca y cols., 2008; Vickers y cols., 2008**). De este modo, estas influencias tempranas del desarrollo, en combinación con una dieta pobre o con una ingesta en exceso de calorías y una insuficiente actividad física, contribuyen, en gran medida, al aumento de la obesidad y sus complicaciones secundarias.

En la etapa adulta, las funciones endocrinas, incluyendo el metabolismo, pueden estar condicionadas por los cambios que se producen durante el desarrollo, tanto en la alimentación, como en los desequilibrios hormonales y en el aumento del estrés (**Bowman y cols., 2004; Bouret y Simerly, 2006; Erhuma y cols., 2007; Delahaye y cols., 2008**). Por otra parte, existen evidencias que sugieren que la respuesta que se genera es diferente en

machos y hembras, siendo diferentes sus respuestas a muchos de estos cambios tempranos (Bowman y cols., 2004; Erhuma y cols., 2007; Vickers y cols., 2008; García-Cáceres y cols., 2010). No obstante, la gran mayoría de los estudios publicados no evalúan de forma comparativa las respuestas en ambos sexos. De hecho, gran parte de los estudios que analizan los efectos de cambios tempranos sobre el metabolismo en el adulto se realizan en machos. De ser diferentes las respuestas en machos y hembras, las medidas de intervención también deberían diferir en ambos sexos.

Muchos de los estudios sobre los aspectos cuantitativos de la sobrenutrición o de la malnutrición temprana se realizan a través de la manipulación del tamaño de camada durante la lactancia (Plagemann y cols., 1999a) o la restricción del alimento materno durante la gestación y/o la lactancia (Huizinga y cols., 2001). La reducción del tamaño de la camada durante el periodo de lactancia es una manipulación experimental, relativamente no invasiva, que se traduce en una mayor ingesta, debida a la mayor disponibilidad de leche materna. Esta manipulación del tamaño de la camada induce aumento del peso y de la ingesta en los animales procedentes de camadas pequeñas, no sólo durante la lactancia, sino también durante la pubertad y etapa adulta del animal, así como hiperleptinemia e hiperinsulinemia (Boullu-Ciocca y cols., 2005; Boullu-Ciocca y cols., 2008; Glavas y cols., 2010). Al contrario, un aumento del tamaño de la camada puede inducir la desnutrición neonatal, que también tiene efectos metabólicos de larga duración (Wilson y Hughes, 1997; Erhuma y cols., 2007; Delahaye y cols., 2008). Sin embargo, aún se ignora si el aumento de peso y el metabolismo están afectados por igual en machos y hembras por estos cambios en la ingesta nutricional precoz.

1.2. Efecto del tipo de dieta sobre la obesidad

El tipo de energía que se consume influye de forma diferente en el aumento de peso y en la composición corporal (Gibson, 1996; Ludwig y cols., 2001; Elliott y cols., 2002; Erhuma y cols., 2007; Gibson, 2008), puesto que ante las diversas proporciones de los nutrientes en la dieta predominan diferentes vías metabólicas, cuyos productos finales repercuten tanto al sistema central como periféricamente. Esta modificación de la proporción de los macronutrientes en la alimentación tiene diversos efectos. En efecto, las dietas ricas en grasa son un factor importante del mal estado metabólico de un gran

porcentaje de la población, interviniendo en la ganancia de peso y el metabolismo, por lo que ha sido un área activa de investigación (Vickers y cols., 2005; Delahaye y cols., 2008; Vickers y cols., 2008; Glavas y cols., 2010). No obstante, los actuales hábitos alimenticios incluyen no sólo el aumento del consumo de grasa, sino también de los hidratos de carbono.

El incremento del consumo de azúcares también se ha asociado con el actual aumento de la obesidad y sus complicaciones secundarias (Gibson, 1996; Elliott y cols., 2002; Havel, 2005; Bray, 2006; Hofmann y Tschöp, 2009). Este aumento en el consumo de carbohidratos se debe, en parte, al aumento de la ingesta de bebidas azucaradas, las cuales contienen en muchos casos jarabe de maíz (con niveles elevados de fructosa), que se compone de 55% de fructosa y 45% de glucosa o sacarosa, que está compuesta por un 50% de fructosa y un 50% de glucosa. Se ha hipotetizado que la fructosa no es capaz de estimular la producción de insulina o la de leptina por el tejido adiposo, mientras que la glucosa sí estimula la producción de estas hormonas, lo que genera diferentes respuestas metabólicas (Elliot y cols., 2002; Havel, 2005; Stanhope y Havel 2008). La sacarosa tiene efectos intermedios entre los de la fructosa y la glucosa en algunos parámetros metabólicos, pero no en otros (Stanhope y Havel, 2008).

Por lo tanto, el aumento en la ingesta de azúcar no sólo constituye una carga calórica extra, sino que también puede afectar el metabolismo general del animal. Sin embargo, la respuesta de la ganancia de peso con el consumo de azúcar aún no está aclarada, ya que los diversos estudios que muestran el efecto de la ingesta de carbohidratos sobre la variación de peso son contradictorios, indicando algunos que el peso puede verse aumentado (Ludwig y cols., 2001; Raben y cols., 2002; Alzamendi y cols., 2010; Couvreur y cols., 2011), disminuido (Lewis y cols., 1992; Hill y Prentice, 1995; Gibson, 1996; Cambri y cols., 2010) o no encontrarse afectado por este tipo de dieta (Sclafani y cols., 1987, Soria y cols., 2001; Yanovski, 2003; Michaels y Holtzman, 2007; Avena y cols., 2008; Gibson, 2008; Chun y cols., 2010). Estos resultados contradictorios detectados en la bibliografía podrían deberse a los diferentes tipos de azúcares empleados en los experimentos, a la duración de la intervención dietética, a la edad en que el azúcar es introducido en la dieta e incluso al sexo de los animales empleados en el estudio. Todo ello hace necesario un mejor conocimiento del control metabólico para poder abordar posibles estrategias terapéuticas.

2. Control metabólico

La regulación de la homeostasis energética requiere una coordinación precisa entre las señales periféricas, que informan sobre las reservas energéticas del organismo, y el SNC (**Fioramonti, 2007; Hahn, 1998**). Existen señales de saciedad que indican tanto la cantidad de alimento ingerido como la composición de nutrientes del mismo, información sensorial procedente del tubo digestivo y que llega al SNC a través del nervio vago y del ganglio cervical superior (**Halford y Blundell, 2000**). Igualmente, el SNC recibe la información de los nutrientes absorbidos, de su utilización así como de las reservas a través de diversas hormonas, como insulina, leptina, ghrelina, adiponectina o interleuquinas.

Aunque diversas regiones cerebrales, como el núcleo del tracto solitario, la amígdala y el córtex prefrontal, entre otras, están implicadas en el control metabólico, el hipotálamo es considerado como la región del SNC clave en el control del apetito y de la ingesta (**Hahn, 1998; Schwartz y cols., 2000; Horvath, 2005; Fioramonti, 2007**), siendo el centro integrador de las señales periféricas anteriormente indicadas, tanto de las hormonas como de metabolitos tales como glucosa o ácidos grasos. Este control lo realiza, fundamentalmente, mediante neuronas especializadas que se localizan en diversos núcleos hipotalámicos, particularmente el núcleo arcuato, el paraventricular (PVN) y el ventromedial (VMN) (**Elmquist y cols., 1999; Horvath, 2005; Barrios y cols., 2007; Mühlhäusler y cols., 2008**).

2.1. El hipotálamo

Los primeros indicios o sospechas acerca de la función relevante que desempeña el hipotálamo en el control de la ingesta y en la regulación del balance energético, se obtuvieron en estudios realizados en los años 1940 y 1950 en animales con lesiones cerebrales en diversas estructuras del hipotálamo (**Hetherington y Ranson, 1940; Hetherington y Ranson, 1942; Brobeck y cols., 1943**). Posteriormente, estas evidencias se observaron en pacientes obesos con tumores hipotalámicos (**Brobeck, 1946**). Las pruebas obtenidas mostraron que un daño grave en áreas mediobasales del hipotálamo, en particular en el VMN del mismo, estaban asociadas con un mayor consumo de alimentos, obesidad mórbida y resistencia a la insulina, mientras que las lesiones en las

estructuras del hipotálamo lateral se asociaban con anorexia y adipsia (Anand y Brobeck, 1951).

2.1.1. Anatomía del hipotálamo

El hipotálamo forma parte de la región ventral del diencefalo. En humanos, se encuentra anterior al surco hipotalámico, detrás del tálamo y por encima del tallo cerebral. Limita 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. Está compuesto por múltiples subdivisiones nucleares de cuerpos neuronales, cada uno de los cuales está implicado en diversas funciones, de manera que el hipotálamo ha de ser capaz de responder a señales de diferente tipo y origen (Haines, 2010).

El hipotálamo puede dividirse en diferentes regiones (Figura 1):

- Zona hipotalámica lateral: Se extiende a lo largo de su eje rostro-caudal y se separa de la zona medial por una línea trazada en el plano sagital a través del fórnix. Está compuesta por agrupaciones difusas de neuronas entremezcladas con haces de axones con una orientación longitudinal que forman el fascículo telencefálico medial y que tienen una organización difusa en el cerebro humano.

En el área lateral no hay núcleos aislados con propia denominación, aunque algunos expertos consideran el núcleo supraóptico como parte de ella.

Las células del área hipotalámica lateral participan en la función cardiovascular y en la regulación del consumo de alimentos y agua. La estimulación de este área, como se ha indicado anteriormente, disminuye el apetito y genera una serie de respuestas anabólicas, incluyendo el incremento en la secreción de insulina, afectando a la lipogénesis en el tejido adiposo (Uyama y cols., 2004).

- Zona hipotalámica medial: Se divide en tres regiones desde su extremo rostral al extremo caudal: quiasmática, tuberal y mamilar. Esta zona contiene grupos bien definidos de neuronas con funciones y conexiones determinadas.

- En la *región quiasmática* existen cinco núcleos neuronales diferentes: preóptico, supraóptico, PVN, anterior y supraquiasmático. En general, estas estructuras están implicadas en la regulación de la liberación hormonal (preóptico, supraóptico, PVN), en el funcionamiento cardiovascular (anterior),

en los ritmos circadianos (supraquiasmático) y en la temperatura corporal y los mecanismos de pérdida de calor (preóptico).

- En la *región tuberal* se encuentran los núcleos dorsomedial (DMN), VMN y ARC. El VMN se considera el centro del control de la ingestión de alimentos (saciedad). Las lesiones bilaterales de esta región hipotalámica producen hiperfagia, con la consiguiente obesidad, así como la activación de una serie de respuestas catabólicas, incluyendo hiperglucemia, lipólisis en el tejido adiposo e incremento en la secreción de glucagón (Uyama y cols., 2004).

- A niveles caudales, la *región mamilar* está constituida por el núcleo posterior y los núcleos mamilares. En la especie humana, los núcleos mamilares constan de un gran núcleo medial y otro pequeño núcleo lateral. Los núcleos mamilares están implicados en el control de varios reflejos asociados con la alimentación, así como en los mecanismos relacionados con la formación de los recuerdos.

- Zona periventricular, incluye las neuronas que rodean las superficies endimarias del tercer ventrículo.

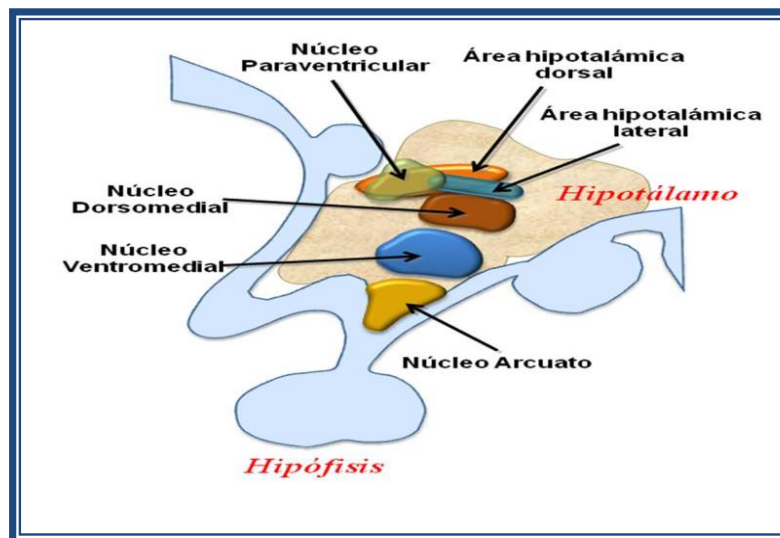


Figura 1. Regiones y núcleos principales del hipotálamo.

2.1.2. Funciones del hipotálamo

El hipotálamo está implicado en actividades viscerales de carácter motor y sensitivo, y en actividades endocrinas. Tanto él como las estructuras límbicas con las que se relaciona reciben impulsos sensitivos acerca del medio interno y regula los sistemas motores que lo modifican mediante cuatro mecanismos: modula el funcionamiento del sistema nervioso autónomo; es un transductor sensitivo visceral, que responde a los cambios de temperatura u osmolaridad de la sangre así como a concentraciones hormonales específicas en la circulación general; regula la actividad de la adenohipófisis a través de la producción de factores de liberación (hormonas liberadoras de hormonas); y lleva a cabo una función endocrina mediante la fabricación y liberación a la circulación general de oxitocina y vasopresina desde la neurohipófisis.

El hipotálamo recibe información del resto del organismo a través del líquido cefalorraquídeo, que rellena el tercer ventrículo con el que está en contacto mediante los tanicitos, células gliales ependimales que constituyen una capa que delimita el tercer ventrículo. Además, la eminencia media permite el transporte de hormonas peptídicas y proteínas desde y hacia el sistema porta, sistema que conecta el hipotálamo con la hipófisis. Por otra parte, el hipotálamo recibe igualmente información mediante numerosos sistemas axónicos, que constituyen el sistema de fibras aferentes. La salida de información desde el hipotálamo se realiza mediante una gran variedad de fibras eferentes (Haines, 2010).

2.1.3. El núcleo arcuato del hipotálamo

El núcleo arcuato del hipotálamo (ARC) es el centro encargado del control de diversas funciones endocrinas, siendo un núcleo clave en la regulación del apetito. En ratones, las lesiones de este núcleo generan obesidad e hiperfagia. Además, está involucrado en el control del crecimiento y reproducción.

Su situación entre el tercer ventrículo y la eminencia media hace que tenga una posición estratégica para integrar señales periféricas, permitiendo el control de la ingesta de alimentos (Cone y cols., 2001; Simpson y cols., 2009). Las células del núcleo ARC liberan péptidos al sistema porta y, a través de estos vasos, a la adenohipófisis. Algunos de estos péptidos son hormonas liberadoras que producen un incremento de la secreción de hormonas específicas en la adenohipófisis, y otras son hormonas inhibidoras que

inhiben dicha secreción (**Haines, 2010**). Además, el ARC presenta una gran cantidad de receptores de ghrelina, leptina e insulina, por lo que las neuronas de este núcleo son reguladas por los niveles circulantes de dichas hormonas (**Sasaki y Kitamura, 2010**).

Las vías efectoras centrales que regulan el peso corporal en respuesta a la información proveniente de las señales que informan de la adiposidad periférica comprenden una red compleja de neuropéptidos que pueden dividirse en dos categorías:

- *Neuropéptidos orexigénicos*, que promueven la ganancia de peso incrementando la ingesta y disminuyendo el gasto energético.
- *Neuropéptidos anorexigénicos*, los cuales promueven la pérdida de peso mediante la disminución de la ingesta y el incremento en el gasto energético.

En el ARC destacan dos poblaciones neuronales, denominadas neuronas de primer orden, que expresan estos neuropéptidos y que se ven afectadas por ghrelina, leptina e insulina. Dichas neuronas, son las que siguen:

- Población neuronal que coexpresa el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada con agouti (AgRP), ambas con efectos orexigénicos, que incrementan la ingesta de alimentos (**Hahn y cols., 1998**). Son neuronas inhibidas por leptina e insulina y activadas por los estados de balance energético negativo o por deficiencia de leptina o insulina.
- Una población de neuronas con función anorexigénica, que inhibe la ingesta de alimentos, y co-expresa el transcrito relacionado con cocaína y anfetamina (CART) y proopiomelanocortina (POMC) (**Ellacott y Cone, 2004**). La expresión de POMC escinde postranscripcionalmente en péptidos denominados melanocortinas (**Cone, 2005**), entre ellos el α -MSH (**Harmer y Bicknell, 2004; Millington, 2007**), el cual realiza sus efectos anorexigénicos a través de los receptores de melanocortinas MC3-R y MC4-R (**Huszar y cols, 1997; Chen y cols., 2000; Harrold y cols., 2003**). Estas neuronas con función anorexigénica están inervadas por las neuronas de NPY/AgRP.

Estas poblaciones neuronales son sitios de convergencia de señales centrales y periféricas de los depósitos energéticos del organismo. Las señales procedentes del cuerpo y del cerebro convergen en los circuitos de melanocortina y modulan

profundamente la actividad de estos circuitos (Cowley, 2003). Sus proyecciones se comunican con otras áreas del hipotálamo implicadas en la regulación del apetito, como el PVN, DMN y el área hipotalámica lateral (Simpson y cols., 2009). Las neuronas POMC y NPY/AgRP se proyectan al hipotálamo lateral y al área adyacente perifornical, donde realizan conexiones monosinápticas con neuronas que expresan neuropéptidos anabólicos como la hormona concentradora de melanina y las orexinas A y B. Además, se proyectan al núcleo PVN, área que se comunica con la corteza cerebral y se cree que participa, junto con el hipotálamo lateral, en la transducción de la señal de leptina en la modulación del hambre. Igualmente estas neuronas comunican con áreas del tronco cerebral involucradas en el control de la ingesta alimentaria como el núcleo del tracto solitario, directamente por conexiones monosinápticas e indirectamente, mediante el núcleo PVN y el hipotálamo lateral (Mendieta-Zerón y cols., 2007).

Las neuronas NPY del núcleo arcuato expresan el receptor de los secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS-R) o receptor de ghrelina (Kojima y cols., 1999; Willesen y cols., 1999; Tschöp y cols., 2000). Estudios de electrofisiología han demostrado que la ghrelina es capaz de inhibir a las neuronas de POMC (Nakazato y cols., 2001). Igualmente, las neuronas NPY (Baskin y cols., 1999; Schwartz y cols., 2000; Williams y cols., 2010) y las neuronas POMC (Cheung y cols., 1997; Schwartz y cols., 2000; Cowley y cols., 2001; Williams y cols., 2010) expresan el receptor de leptina.

El ARC es el único sitio del hipotálamo que expresa la enzima ácido graso sintetasa, por lo que ha sido propuesto como un sitio sensible a sustancias del metabolismo de los ácidos grasos (Loftus y cols., 2000). En el ARC destaca también una pequeña población de neuronas adyacente al tercer ventrículo que envía fibras a las neuronas NPY de diversas regiones hipotalámicas y que produce y secreta ghrelina, probablemente con efectos locales diferentes a los producidos por la ghrelina plasmática y encaminados a la regulación de la homeostasis energética. Estas fibras de ghrelina también hacen contacto con otras clases de neuronas hipotalámicas (Olney, 1969; Cowley y cols., 2003).

En los núcleos hipotalámicos implicados en el control de la función neuroendocrina y de la homeostasis energética, las neuronas y células gliales presentan la capacidad de detectar y regular los niveles circulantes de glucosa (Fioramonti y cols., 2004; Levin y cols., 2004; Song y cols., 2001) mediante transportadores localizados en sus

membranas (Levin y cols., 2004). Además, en el hipotálamo existen poblaciones neuronales denominadas neuronas glucosensibles, las cuales utilizarían un sistema de detección de glucosa similar al de las células pancreáticas, modificando su actividad en función de las concentraciones externas de glucosa (Song y cols., 2001; Levin y cols., 2004; Wang y cols., 2004). De esta manera actúan como sensores del estado metabólico y como reguladores de la homeostasis energética (Levin y cols., 2004). Sin embargo, en la obesidad esta capacidad se ve alterada, pudiendo contribuir a los resultados adversos que conlleva esta enfermedad (Levin y cols., 1999; Levin y cols., 2004).

2.2. Los astrocitos y el control metabólico

El SNC está formado por distintos tipos de células: las neuronas, las células de la glía y las células endoteliales. Las neuronas son las células responsables de la transmisión de la información gracias a su capacidad de transmitir el impulso nervioso. Aunque ésta constituye, sin duda, la función más relevante del SNC, las células no neuronales desempeñan también funciones muy importantes. Dentro de las células de gliales, donde se distinguen células ependimarias, células macrogliales y células microgliales, encontramos a los astrocitos, células macrogliales que constituyen la glía mayoritaria del SNC (Figura 2).

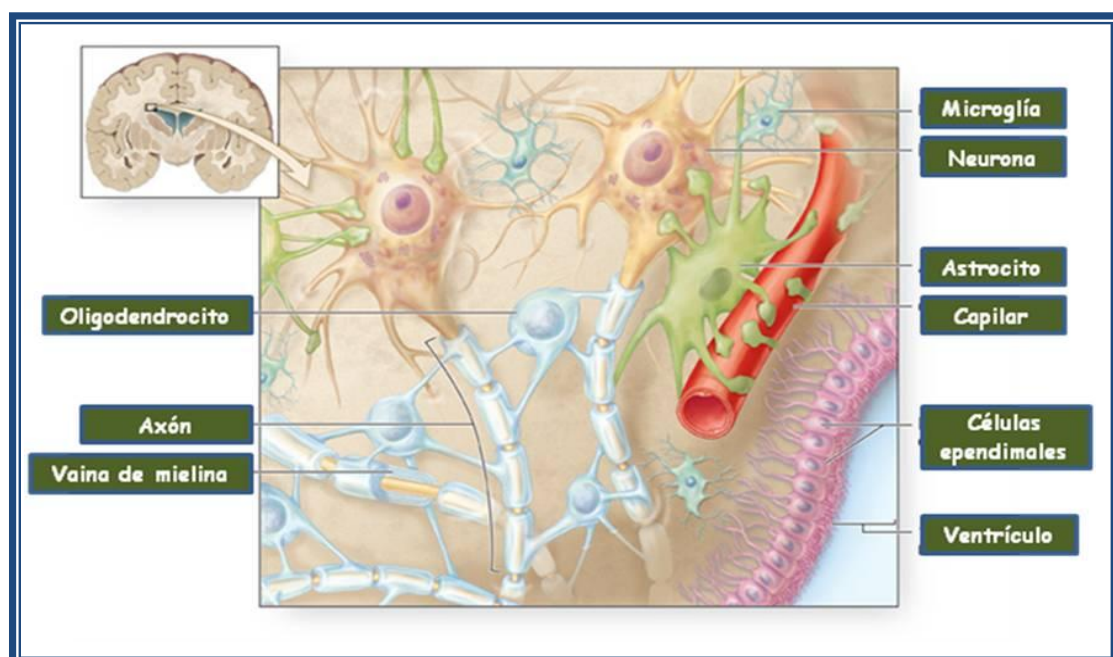


Figura 2. Disposición de las neuronas, células gliales y capilares sanguíneos.

En el cerebro, las neuronas y los astrocitos forman un complejo fundamental para el mantenimiento de la función neural y del metabolismo cerebral (Escartín y cols., 2006; Aubert y cols., 2007). A pesar de que han sido considerados como células básicas para el soporte neuronal, actualmente se les ha atribuido diversas funciones importantes en el cerebro, tanto durante el desarrollo como en el adulto.

Entre las diferentes funciones que se han descrito para los astrocitos cabe destacar las siguientes:

- Apoyo a la proliferación y diferenciación neuronal durante el desarrollo (Stevens, 2008; Cina y cols., 2009; Kosodo y Huttner, 2009).
- Modulación de la plasticidad sináptica. Se ha observado que los astrocitos integran y procesan la información sináptica y difunden diferentes moléculas que afectan a la función y plasticidad sináptica (Araque y cols., 1999; Volterra y Steinhaüser, 2004; Panatier y cols., 2006; Theodosis y cols., 2008; Perea y cols., 2009; Freeman, 2010).
- Mantenimiento de la homeostasis iónica y de neurotransmisores (Philippi y cols., 1996; Seifert y cols., 2006).
- Soporte metabólico a las neuronas (Medina y cols., 1999, Pellerin, 2003; Rouach y cols., 2008). Se encargan también de incorporar iones y diversos sustratos desde la circulación al cerebro para las neuronas, regulando el ambiente extracelular de las neuronas (Fields y Stevens-Graham, 2002).
- Función neuromoduladora (Araque, 2008; Bonansco y cols., 2011).
- Función neuroprotectora (Vega-Agapito y cols., 2002). Participación en procesos neuroendocrinos, pues se ha observado que los astrocitos responden a distintos factores y hormonas como el estradiol (García-Segura y cols., 1996). Además, esta hormona regula la expresión de diferentes moléculas en los astrocitos que son importantes para las respuestas fisiológicas de estas células, como los transportadores de glutamato GLT-1 y GLAST (Pawlak y cols., 2005).

Los astrocitos son parte de la barrera hematoencefálica (BHE), lo que les convierte en piezas fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis neuronal. Mantienen la homeostasis del espacio extracelular y detectan los requerimientos de metabolitos por parte de las neuronas a través de diferentes moléculas mensajeras, como

glutamato, K^+ , óxido nítrico, peróxido de hidrógeno y amonio, entre otros (Dienel y Hertz, 2001; Aubert y cols., 2007; Rouach y cols., 2008).

Igualmente es importante el papel de estas células gliales sobre la plasticidad sináptica, realizando una función neuromoduladora. En la década de los 90 se propuso el término “sinapsis tripartita” para hacer referencia a la comunicación bidireccional existente entre astrocitos y neuronas, indicando que los astrocitos intercambian información con los elementos de las sinapsis, respondiendo a la actividad sináptica y regulando la transmisión (Araque y cols., 1999) (Figura 3). En este sentido, se ha observado que los astrocitos regulan la transmisión sináptica, pudiendo contribuir a la plasticidad sináptica a largo plazo (Perea y cols., 2009). Recientes estudios, en los que se observa que la liberación espontánea de glutamato desde los astrocitos podría regular la transmisión sináptica, indican que la actividad de los astrocitos podría proporcionar un nuevo mecanismo no neuronal de primer orden para la transferencia de información en el SNC (Bonansco y cols., 2011).

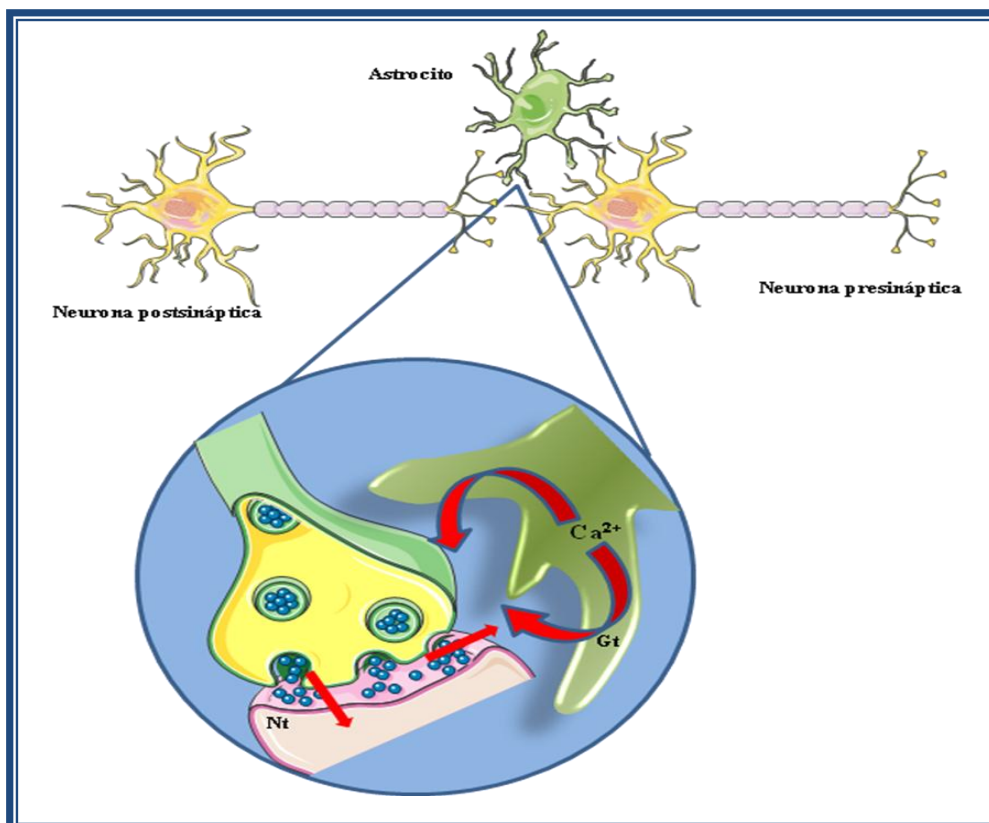


Figura 3. Esquema representativo de la transferencia de información entre las neuronas y los astrocitos en la sinapsis tripartita. Nt: Neurotransmisor, Gt: gliotransmisores.

Muchas de las funciones que realizan los astrocitos han sido profundamente estudiadas y actualmente son bien conocidas; sin embargo, el papel de los astrocitos en el control metabólico es menos conocido. Los astrocitos maduros expresan específicamente el receptor α activador de la proliferación de peroxisomas, el cual juega un papel crítico como sensor y regulador del metabolismo lipídico (Peters y cols., 1997; Berger y Moller, 2002). Igualmente, la apolipoproteína E (apoE), lipoproteína que se encarga del transporte de lípidos como el colesterol y los triglicéridos, en la periferia es sintetizada por el hígado y en el cerebro es producida específicamente por los astrocitos (Boyles y cols., 1985). Por esta razón se considera que los astrocitos sean los sensores lipídicos del cerebro (Yi y cols., 2011). Además, como se ha indicado anteriormente, estas células expresan receptores para diversas hormonas periféricas, como la leptina, expresión que incrementa por la obesidad (Pan y cols., 2008; Dallaporta y cols., 2009; Hsuchou y cols., 2009). Todo ello convierte a estas células gliales en una parte muy importante del control metabólico, llegando a tener una función relevante en la regulación de la ingesta; de ahí que sea necesario profundizar aún más en el estudio de los astrocitos para el tratamiento de la obesidad.

3. Glucosa y transportadores de glucosa

La glucosa es considerada el principal nutriente para las células del sistema nervioso adulto. Aunque el peso del cerebro maduro constituye sólo entre el 2-3% del total del peso corporal, este órgano puede consumir una cuarta parte de la de glucosa suministrada al organismo (Clarke y Sokoloff, 1994). Sólo una pequeña porción de esta glucosa se utiliza para los procesos de biosíntesis y la mayor parte es consumida en el metabolismo energético. En la década de los 70 se estableció como dogma central del metabolismo energético que la glucosa era el combustible del cerebro de los mamíferos y el único sustrato capaz de soportar por completo la actividad neuronal (Siesjö, 1978). No obstante, actualmente esta hipótesis está cuestionada por diversas escuelas.

Los niveles centrales de glucosa desempeñan una función crítica en la regulación del metabolismo energético (Penicaud y cols., 2002). En el hipotálamo existe una población de neuronas especializadas que utilizan la glucosa como una molécula señal capaz de

regular su potencial de membrana y su frecuencia de potencial de acción. Son las neuronas glucosensibles (Ashford y cols., 1988; Wang y cols., 2004). Existen dos poblaciones de neuronas glucosensibles, según sean excitadas o inhibidas por la glucosa, localizadas fundamentalmente en el NVM y en el ARC (Levin y cols., 2004; Burdakov y cols., 2005) e involucradas en el control de la ingesta y de la homeostasis de la glucosa (Marty y cols., 2007). La literatura actual parece sugerir que el rasgo característico de neuronas glucosensibles es la presencia en ellas de glucocinasa y de la proteína quinasa activada por 5'-adenosín monofosfato (AMPK). Curiosamente, esto sugeriría que el mecanismo de detección de la glucosa puede ser un mecanismo universal, incluso si la célula se activa o se inhibe por la glucosa (Levin y cols., 2011).

3.1. Transportadores de glucosa

El transporte de la glucosa a través de la membrana celular se lleva a cabo por dos familias de proteínas:

- 1) La familia de cotransportadores de Na⁺-glucosa, los cuales realizan el transporte de glucosa en contra de gradiente de concentración acoplado al transporte de sodio, utilizando ATP. Estos transportadores se expresan principalmente en la membrana apical de las células epiteliales del intestino y del riñón y transportan la glucosa en contra del gradiente de concentración, para lo cual utilizan ATP (Ferraris, 2001).
- 2) La familia de transportadores de glucosa constituida por proteínas facilitadoras del transporte de glucosa independientes del Na⁺ (GLUT). La mayoría de las células de mamíferos incorporan la glucosa a través los GLUTs, proteínas de membrana que permiten el paso del monosacárido a favor de un gradiente de concentración (Lienhardy cols., 1992). La incorporación de la glucosa a las células está controlada por los niveles de expresión de estos transportadores en la superficie celular, lo que está regulado por diversas señales específicas, tales como las concentraciones de glucosa (Boado y Pardridge, 1993). Estas proteínas permiten igualmente el transporte de la glucosa desde la sangre al cerebro a través de la BHE y, una vez ahí, al interior de neuronas y células gliales.

LeFevre postuló que era necesario un componente de la membrana celular para permitir el paso de la glucosa a través de la bicapa lipídica de las células (LeFevre, 1948).

Años más tarde, Widdas (Widdas, 1952) propuso un mecanismo de transporte para explicar los cambios cinéticos observados en el transporte de glucosa a través de la placenta de oveja. Sin embargo, no fue hasta la década de 1970 cuando se demostró que el transporte de glucosa estaba mediado por una proteína embebida en la membrana plasmática (Kasahara y Hinkle, 1977). La primera clonación del ADNc que codifica para un transportador de glucosa (GLUT-1) se produjo en 1985 (Mueckler y cols., 1985), siendo los otros trece miembros de la familia de los GLUTs identificados posteriormente (Uldry y Thorens, 2004).

Todos estos transportadores están constituidos por unos 500 aminoácidos y por 12 dominios transmembrana en forma de α -hélice. Los dominios amino y carboxilo terminales se localizan en el citoplasma. Para el transporte de glucosa se forman puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y carbamino del GLUT y los grupos hidroxilo de la glucosa (Lienhard y cols., 1992). Para el ingreso de la glucosa al interior celular se sugiere que, tras la unión del azúcar al transportador en la cara externa de la membrana, éste cambia de conformación, pasando de una conformación exofacial a una endofacial, de manera que la glucosa y su sitio de unión quedan en la cara interna de la membrana. Finalmente, el transportador libera la glucosa en el citoplasma y el transportador, ya libre, cambia nuevamente su conformación, exponiendo el sitio de unión a la glucosa en la cara externa de la membrana celular (Carruthers, 1990) (Figura 4).

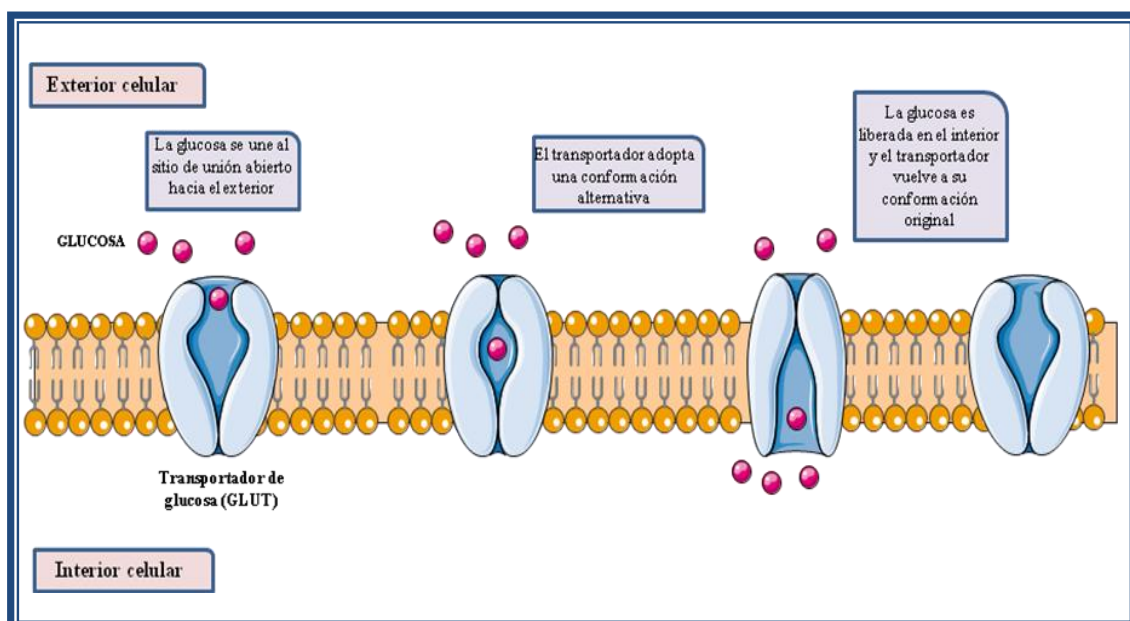


Figura 4. Transporte de glucosa al interior celular.

Cada una de las isoformas de esta familia de transportadores tiene una ubicación y características propias, tal y como se indican en la Tabla 1. Aunque la caracterización funcional de estas isoformas requiere estudios más exhaustivos, se sabe que los miembros de esta familia difieren entre sí en su distribución tisular, sus propiedades cinéticas y su especificidad por el sustrato.

Transportador	Sitios de expresión	Función
GLUT-1	Eritrocito, nefrona. BHE (Dick y cols, 1984) y retiniana (Mantych y cols., 1993a) Cerebro: células gliales y neuronales (Rayner y cols., 1994)	Ingreso basal de glucosa. Transporte de galactosa, manosa y glucosamina (Merrall y cols., 1993)
GLUT-2	Células β del páncreas, hígado, nefrona proximal, intestino delgado (Thorens, 1992). Cerebro: células gliales (Leloup y cols., 1994)	Sensor de glucosa del páncreas, transporte de glucosa en la membrana basolateral del intestino y riñón. Ingreso de glucosa en astrocitos (Marty y cols., 2005)
GLUT-3	Placenta, hígado, riñón, corazón, espermatozoides y testículos (Burant y Davidson, 1994; Stuart y cols., 1999; Wood y Trayhurn, 2003; Uldry y Thorens, 2004). Cerebro: neuronas (Brant y cols., 1993; Nagamatsu y cols., 1993; Gerhart y cols., 1995)	Ingreso basal de glucosa. Transporte de galactosa, manosa, maltosa y xilosa
GLUT-4	Músculo esquelético y cardíaco, tejido adiposo. Baja expresión en cerebro (Rayner y cols., 1994)	Ingreso de glucosa estimulado por la insulina (Bryant y cols., 2002)
GLUT-5	Yeyuno, espermatozoides, músculo esquelético, riñón. Cerebro: microglía (Mantych GJ y cols. 1993b)	Transporte de fructosa y glucosa
GLUT-6	Bazo, leucocitos	Ingreso de glucosa (Doege y col., 2000)
GLUT-7	Membrana apical de células intestinales (Thorens y Mueckler, 2010)	Ingreso de glucosa y fructosa
GLUT-8	Testículos, músculo esquelético, corazón, intestino delgado, placenta. Cerebro (Ibberson y col., 2000)	Ingreso de glucosa (Ibberson y col., 2000)
GLUT-9	Riñón, hígado, intestino y condrocitos (Doege y col., 2000; Thorens y Mueckler, 2010)	Transporte de glucosa y fructosa (Doege y cols., 2000; Carayannopoulos y cols., 2004)
GLUT-10	Hígado, páncreas y tejido adiposo (Dawson y cols., 2001; McVie-Wylie y cols., 2001)	Transporte de glucosa (Dawson y cols., 2001)
GLUT-11	Músculo esquelético y corazón (Doege y col., 2001)	Ingreso de glucosa y fructosa (Wu y cols., 2002)
GLUT-12	Músculo esquelético, tejido adiposo, intestino delgado (Rogers y col., 2002)	Ingreso de glucosa (Thorens y Mueckler, 2010)
GLUT-13	Cerebro (Thorens y Mueckler, 2010)	Transporte del mioinositol (Uldry y cols., 2001)
GLUT-14	Testículos (Thorens y Mueckler, 2010)	Transporte de glucosa

Tabla 1. Sitios de expresión y funciones de los transportadores de glucosa (GLUT).

3.1.1. Transportador de glucosa GLUT-1

Se trata de una proteína de 664 aminoácidos codificada por un gen localizado en el cromosoma 1 de humanos (Cloherty y cols., 1996) (Figura 5). Fue el primer transportador de glucosa clonado de la línea celular HepG2 (Mueckler y cols., 1985). Se expresa en todos los tipos celulares y originariamente se pensaba que era el único transportador de glucosa expresado en el cerebro. La regulación de la expresión de GLUT-1 parece realizarse mediante un control transcripcional y post-transcripcional (McGowan y cols., 1995; Dwyer y cols., 1996). El mensajero de GLUT-1 ha sido detectado en diversas regiones cerebrales, como en corteza, tálamo, hipotálamo, hipocampo, mesencéfalo, tronco del encéfalo y cerebelo (Rayner y cols., 1994).

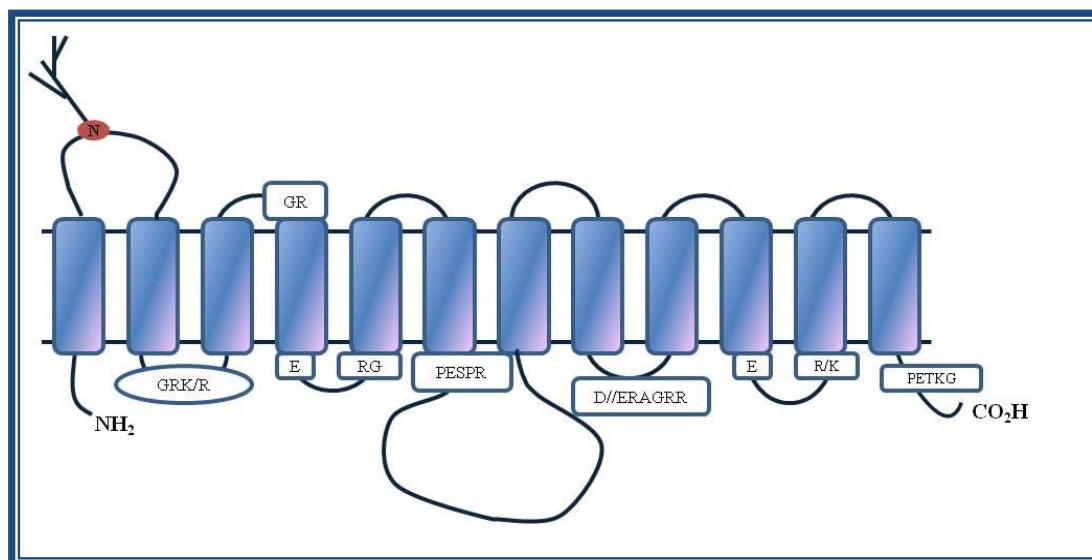


Figura 5. Estructura del transportador de glucosa GLUT-1.

En el cerebro de mamíferos se han detectado dos isoformas de GLUT-1, una de 45 kDa y otra de 55 kDa, ambas procedentes del mismo gen. Su diferencia en el peso molecular es debida a su glicosilación, pero no parecen existir diferencias en su estructura o cinética (Birnbau y cols., 1986). La isoforma de 55 kDa se encuentra exclusivamente en células endoteliales de la BHE, donde se localiza tanto en la membrana luminal como en la abluminal y en el interior celular (Dick y cols., 1984; Farrell y Pardridge, 1991). La isoforma de 45 kDa se localiza en neuronas y en células gliales, así como en las membranas basolateral y apical del plexo coroideo y en el epéndima (Lee y Bondy, 1993). Bajo unas condiciones normales, su expresión está limitada en neuronas; sin embargo, bajo condiciones de estrés o en células en cultivo, su expresión incrementa

en las células gliales (Lee y Bondy, 1993; Gerhart y cols., 1994). Las variaciones en las concentraciones de glucosa circulante regulan la expresión de este transportador (Simpson y cols., 1999). Una hipoglucemia crónica incrementa la expresión de GLUT-1 en la BHE, mientras que una hiperglucemia no modifica su expresión en la barrera (Simpson y cols., 1999). Igualmente, la privación de glucosa en cultivos celulares *in vitro* genera un incremento de la expresión de este transportador, así como un incremento de su actividad (Boado y Pardridge, 1993). Por otra parte, se ha descrito recientemente que niveles elevados de glucemia incrementan la expresión de GLUT-1 en células gliales del hipotálamo y que ese incremento conducía a una disminución de la hiperglucemia sistémica (Chari y cols., 2011).

3.1.2. Transportador de glucosa GLUT-2

Se trata de una proteína de 522 aminoácidos, codificada por un gen localizado en el cromosoma 3 de humanos. Fue clonado de ADNotecas de ADNc de hígado de rata (Thorens y cols., 1988) y humano (Fukumoto y cols., 1988). Tiene una baja afinidad por la glucosa, con una K_m de 17mM; sin embargo, presenta una gran afinidad por la glucosamina ($K_m=0,8$ mM) (Uldry y cols., 2002).

Se expresa en gran medida en las células β del páncreas y en la membrana basolateral del intestino y en células epiteliales del riñón (Thorens, 1992). En el cerebro, GLUT-2 se expresa en áreas cerebrales involucradas en el control de la ingesta, como el hipotálamo, y en el tronco del encéfalo (Ngarmukos, 2001; García MA y cols., 2003), donde principalmente se localiza en astrocitos que actúan como sensores de glucosa (Leloup y col., 1994; Marty y cols., 2005).

Marty y colaboradores indicaron que para una correcta sensibilidad hacia la glucosa es necesaria la localización de este transportador en células gliales (Marty y cols., 2005), lo que apoya la hipótesis de la estrecha comunicación entre astrocitos y neuronas para la detección y utilización de la glucosa. El lactato parece ser una de las moléculas de unión.

3.1.3. Transportador de glucosa GLUT-3

El transportador GLUT-3 es una proteína de 596 aminoácidos, codificada por un gen localizado en el cromosoma 12 de humanos (Figura 6). Esta proteína de 45 kDa, fue clonada inicialmente en una línea celular fetal de músculo esquelético (Nagamatsu y cols., 1992) y, posteriormente, clonada de una gran variedad de cerebros de mamífero.

En cerebro se localiza casi exclusivamente en neuronas, siendo su principal transportador de glucosa, y en roedores se expresa en prácticamente todas las regiones cerebrales (Maher y cols., 1992; Brant y cols, 1993; Nagamatsu y cols., 1993; McCall y col., 1994; Gerhart y cols., 1995). En la periferia se expresa en placenta, hígado, riñón, corazón, espermatozoides y testículos (Burant y Davidson, 1994; Stuart y cols., 1999; Wood y Trayhurn, 2003; Uldry y Thorens, 2004).

Este transportador tiene una gran afinidad por la glucosa y está presente en tejidos donde la demanda de glucosa como combustibles es considerable, como sucede en el cerebro.

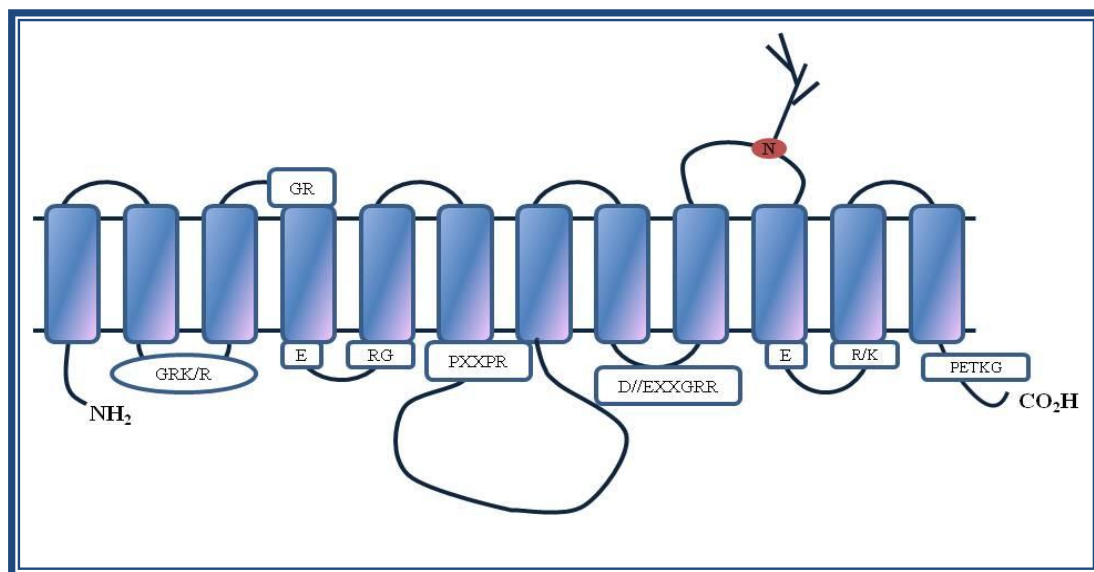


Figura 6. Estructura del transportador de glucosa GLUT-3.

3.2. Glucosa, células gliales y transportadores de glutamato

Aunque la glucosa es el principal sustrato energético para el cerebro, en determinadas situaciones otros sustratos, como el lactato, pueden suministrar parte de la energía necesaria para las neuronas (Pellerin, 2005). Como ya se ha indicado, es necesaria una comunicación entre astrocitos y neuronas para la detención y utilización de glucosa,

estando bien establecido el hecho de que en el SNC, los astrocitos y las neuronas, así como los vasos sanguíneos, trabajan juntos, como unidades funcionales (Freeman, 2010).

Los astrocitos están involucrados en la detección de glucosa y en la modulación de los niveles de glucosa periférica (Lamy cols., 2005), además de proporcionar glucosa al espacio extracelular en el cerebro para su captación por parte de las neuronas. La glucosa es el principal metabolito inicial para el cerebro, almacenándose en forma de glucógeno para amortiguar la hiperglucemia (Tsacopoulos y Magistretti, 1996; Rouach y cols., 2008; Mangia y cols., 2009). Es importante destacar que, en el cerebro, los vasos sanguíneos están casi completamente rodeados por una red de astrocitos (Figura 2), lo que plantea la posibilidad de que la glucosa regule a las neuronas glucosensibles, al menos en parte de forma indirecta, a través de los astrocitos (Levin y cols., 2011).

El metabolismo primario de los astrocitos funciona utilizando ATP procedente de la glucólisis, con la producción y salida de lactato al medio extracelular como última etapa de este proceso (Dienel y Hertz, 2001; Korf, 2006; Schurr, 2006). Los niveles de glucosa extracelular en el cerebro oscilan entre 0,5 y 1,5 mmol/L, mientras que los de lactato son de alrededor de 2,5 mmol/L (Abi-Saab y cols., 2002). Esta elevada concentración de lactato hace que éste sea un metabolito esencial para el metabolismo aerobio neuronal, además de serlo la glucosa, utilizada directamente por las neuronas. Ya en 1994, Pellerin y Magistretti, propusieron la hipótesis del transporte de lactato entre neuronas y astrocitos como posible mecanismo de comunicación entre ambas células. Las células gliales, a través de GLUT-1 y GLUT-2, captan y almacenan la glucosa en su interior en forma de glucógeno, a partir del cual pueden producir lactato para que sea utilizado por las neuronas (Pellerin, 2005). Estos autores sugerían que el lactato es el principal sustrato energético para los astrocitos. En las células neuronales, este lactato es convertido a piruvato, vía lactato deshidrogenasa, que entra en el ciclo de los ácido tricarbóxicos para generar ATP (Figura 7).

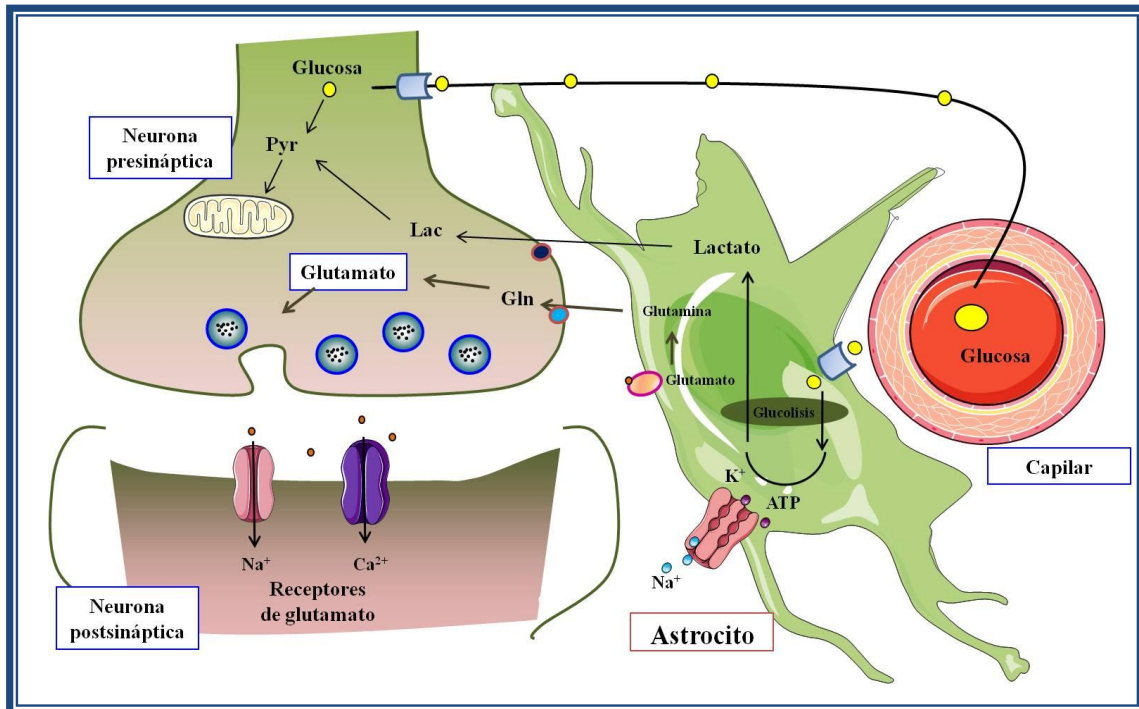


Figura 7. Modelo de comunicación neurona-astrocito. Lac: lactato; Pyr: piruvato; Gln: glutamina.

En este proceso de comunicación entre astrocitos y neuronas ejercen una importante función los transportadores de glutamato. Durante una sinapsis química excitatoria, la neurona presináptica libera a la hendidura sináptica L-glutamato, neurotransmisor que genera una respuesta excitatoria sobre la neurona postsináptica (Figura 8).

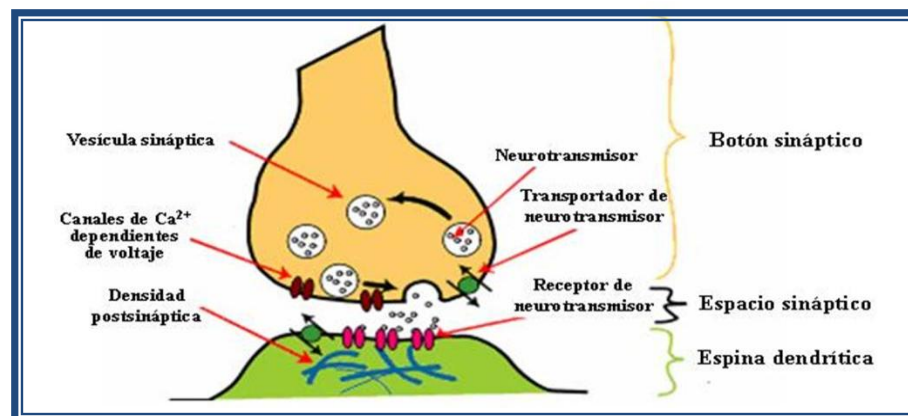


Figura 8. Esquema de una sinapsis química.

La terminación de la señal sináptica es un proceso fundamental para que las neuronas no pierdan su excitabilidad. En este proceso influyen diversos factores como la vida media química del neurotransmisor, ya que algunos son degradados en el espacio

sináptico, siendo a veces reciclados sus componentes por la neurona presináptica para sintetizar nuevos neurotransmisores; la desensibilización de los receptores, que produce el fin de la transducción de la señal a la neurona postsináptica; y los transportadores activos, generalmente en la membrana de la neurona presináptica y en la de la glía adyacente, que retiran el neurotransmisor del espacio sináptico y permiten su reciclaje para futuras neurotransmisiones.

En el caso del L-glutamato, éste es retirado del espacio sináptico gracias a transportadores localizados, fundamentalmente, en los astrocitos. Estos transportadores son bombas iónicas que acoplan el transporte de L-glutamato al simporte o antiporte de Na^+ y K^+ , aprovechando sus gradientes (Cholet y cols., 2002; Yi y Hazell, 2006). Este transporte genera una activación de la glucólisis, favoreciendo la formación de lactato, a partir de la glucosa almacenada en estas células, que, tal y como se ha indicado anteriormente, será utilizado como sustrato energético (Serres y cols., 2003; Serres y cols., 2004; Pellerin, 2005). Pertenecen a la familia de transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT), de la que se han descrito 5 miembros. Los más importantes son EAAT2 (en roedores, transportador de glutamato 1, GLT-1), que acapara el 90% del transporte en el SNC, y EAAT1 (en roedores, transportador de glutamato y aspartato, GLAST) (Yi y Hazell, 2006). Ambos se encuentran preferentemente en la glía (Lehre y cols., 1995), aunque también se ha observado su expresión en neuronas, especialmente en el caso de GLAST (Rothstein y cols., 1994). De esta manera los astrocitos realizan una función neuroprotectora. Se ha observado que, ante la liberación de una cantidad anormalmente elevada de L-glutamato, algo que sucede ante un daño cerebral, como la isquemia o tras un traumatismo cerebral, se ha detectado un incremento en los niveles de transportadores en glía (Beschoner y cols., 2007a y Beschoner y cols., 2007b), en lo que puede ser un intento por proteger a las neuronas y células nerviosas de la degeneración.

Finalmente, esta incorporación del L-glutamato a los astrocitos permite la producción de glutamina gracias a la enzima glutamina sintetasa (Albrecht y cols., 2007). La función mitocondrial y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos en los astrocitos son diferentes que en las neuronas, pues en estas células gliales estos procesos van encaminados a la producción de glutamina para su posterior uso neuronal, ya que las neuronas, a partir de la glutamina, generan de nuevo glutamato (Tsacopoulos y Magistretti, 1996; Rouach y cols., 2008).

4. Comunicación entre el sistema nervioso central y el sistema periférico: modulación de los neuropéptidos hipotalámicos

La regulación de la homeostasis energética requiere una coordinación precisa entre las señales periféricas, que informan acerca de las reservas energéticas del organismo, y el sistema nervioso central. Como ya se ha indicado, el hipotálamo es el centro encargado del control de la ingesta y del gasto energético (Hahn, 1998; Schwartz y cols., 2000; Horvath, 2005; Fioramonti, 2007), encargado de integrar y procesar la información procedente de otras áreas del SNC y de las hormonas circulantes. Entre las señales periféricas que actúan sobre el hipotálamo cabe destacar la ghrelina y la leptina, hormonas capaces de modificar la expresión de los neuropéptidos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta, puesto que en esta región existe una gran cantidad de receptores de ghrelina y leptina (Sasaki y Kitamura, 2010) (Figura 9).

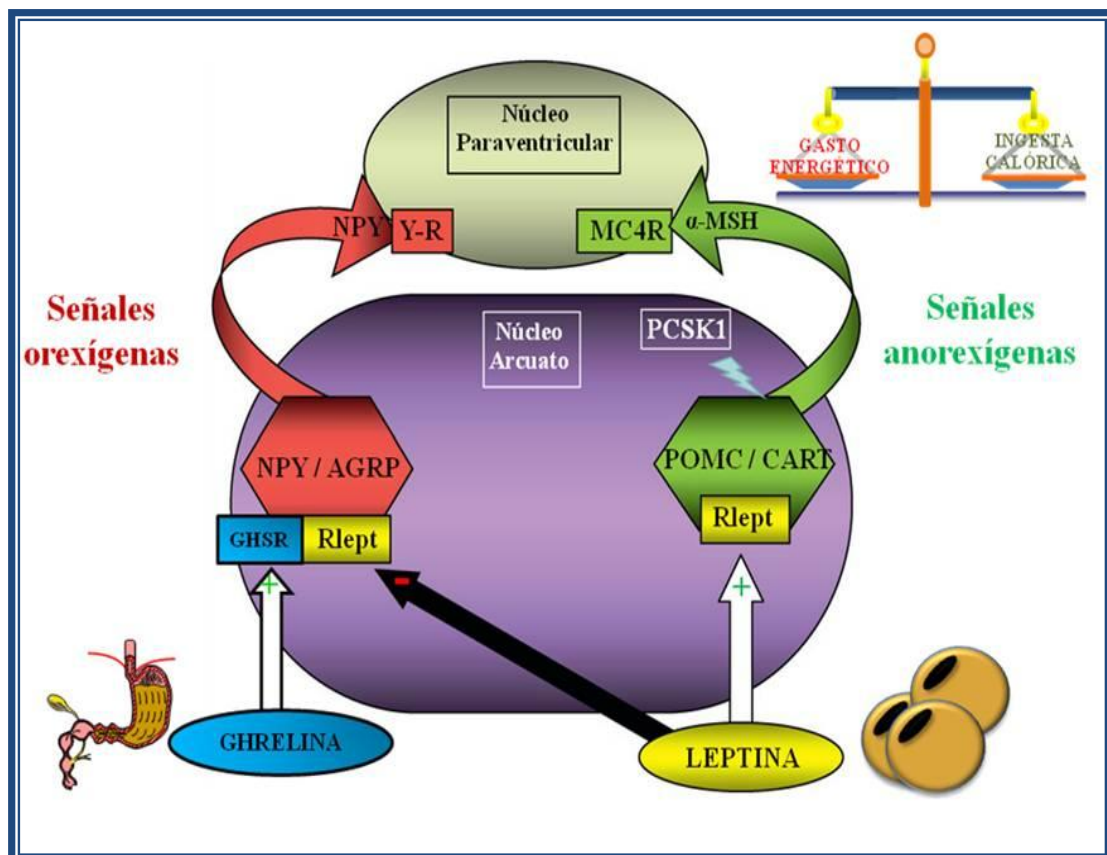


Figura 9. Interacción endocrina y neuronal en la regulación de la homeostasis energética y el apetito. RLept: receptor de leptina; GHSR: receptor de ghrelina; α -MSH: hormona estimuladora de melanocitos; MC4R: receptor de melanocortina tipo 4; Y-R: receptor de NPY.

El tejido adiposo participa en el sistema de retroalimentación negativa de la homeostasis energética, desempeñando una importante función endocrina (Thalmann y Meier, 2007). El tejido adiposo blanco, considerado tradicionalmente como un depósito de energía en forma de triglicéridos (Vázquez-Vela y cols., 2008), es actualmente un reconocido componente activo del organismo con funciones definidas en la homeostasis energética, que sirve como fuente de péptidos y hormonas como la leptina, la adiponectina y la resistina (Galic y cols., 2010; Karastergiou y Mohamed-Ali, 2010), adipoquinas que participan en la regulación autocrina y paracrina dentro del mismo tejido y con efectos endocrinos en la función de órganos distales, tales como el músculo, el páncreas, el hígado y el cerebro, participando así en el control del metabolismo (Ahima, 2005).

4.1. La leptina

El término leptina deriva de la palabra griega *leptos*, que significa delgado. Esta hormona fue descubierta en 1994 por Jeffrey Friedman y colaboradores mediante el estudio de ratones obesos mutantes para el gen *ob*, el gen de la leptina (ratones *ob/ob*), cuya mutación provoca la carencia de leptina sérica (Zhang y cols. 1994). Esta adipoquina, que informa al cerebro del estado energético del organismo, es producida principalmente en el tejido adiposo, donde la secreción se lleva a cabo subcutánea, retroperitoneal y perilinfáticamente. Aunque en menor medida, también se expresa en hígado, estómago, hipotálamo, ovario y placenta (Zhang y cols. 1994; Mantzoros, 1999).

Las concentraciones de leptina en el organismo dependen del sexo, la edad, la ingesta calórica y el índice de masa corporal (Argente y cols., 1997; Dagogo-Jack, 1999; Mantzoros, 1999; Sabath, 2002). Una vez que es secretada a la sangre es capaz de atravesar la BHE y participar en el control de la homeostasis energética, desencadenando respuestas de disminución de la ingesta y de incremento del gasto energético. Su expresión y secreción refleja el estado de adiposidad en humanos y en roedores (Frederich y cols., 1995), correlacionando con el tamaño de los adipocitos en roedores (Houseknecht y cols., 1998). Sin embargo, la leptina no sólo funciona como señal para indicar al cerebro el estado de las reservas energéticas del organismo, sino también como un sensor de la homeostasis energética (Houseknecht y cols., 1998).

4.1.1. Estructura de la leptina

La leptina es una hormona de 146 aminoácidos producida a partir de un precursor de 167 aminoácidos con una secuencia señal de 21 aminoácidos que se separan antes de que la leptina pase a sangre. Tiene un peso molecular de 16 KDa y una estructura terciaria, similar a las citoquinas clase I, con un conjunto de cuatro α -hélices, conectadas por dos dominios largos cruzados y un bucle corto. Presenta un enlace disulfuro intercadena, implicado en su actividad (Frühbeck, 2006) (Figura 10).

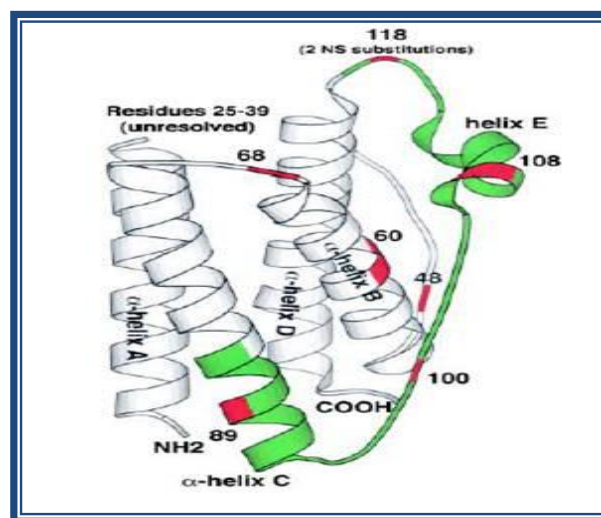


Figura 10. Estructura terciaria de la leptina.

La estructura de la leptina presenta gran similitud en las diversas especies, siendo el porcentaje de homología entre el hombre y el ratón de un 84% y entre el hombre y la rata de un 83%.

El gen *ob*, que en humanos se localiza en el cromosoma 7q31-3 (Isse y cols., 1995), tiene más de 15.000 pares de bases y tres exones separados por dos intrones, y es en los exones 2 y 3 donde se codifica la síntesis de la leptina.

4.1.2. El receptor de la leptina

El receptor de la leptina (ObR) fue identificado en 1995 por Tartaglia y colaboradores. Pertenece a la familia de receptores de citoquinas de clase I y es producto de un *splicing* alternativo del gen *db*. Existen 6 isoformas diferentes de este receptor distribuidas por casi todos los tejidos y nombradas desde ObRa hasta ObRf. Se dividen en distintas clases: isoformas cortas, largas y secretoras (Frühbeck, 2006). Las

formas cortas (ObRa, ObRc, ObRd, y ObRe) carecen de un dominio intracelular corto y sus funciones se han relacionado con el transporte a través de la BHE, el aclaramiento de leptina y con la regulación del sistema inmune entre otras. La isoforma ObRa es la isoforma predominante en la mayoría de los tejidos y células (Tartaglia y cols, 1995).

El receptor de leptina más pequeño es la isoforma ObRe que carece de un dominio intracelular y se trata de una proteína soluble. Puede regular las concentraciones séricas de leptina y actúa como proteína transportadora de esta hormona, para conducirla hasta sus receptores de membrana.

La isoforma más larga de este receptor es denominada ObRb y se expresa mayoritariamente en el hipotálamo, en áreas implicadas en la secreción de neuropéptidos y neurotransmisores que regulan el apetito y el peso corporal (Tartaglia y cols, 1995; Tartaglia, 1997). Sus funciones consisten en mediar las acciones de la leptina en el SNC. Presenta dominios extracelular, transmembrana e intracelular, lo que indica una posible función de transducción de la señal al interior de la célula.

La unión de la leptina al receptor es un proceso en el que están implicadas las proteínas JAK (*Janus Activated Kinases*), una familia de tirosin-quinazas involucradas en la señalización intracelular de citoquinas (Tartaglia, 1997). Su activación genera la fosforilación de miembros de la familia de proteínas intracelulares STAT (*Signal Transducer and Activators of Transcription*), entre ellas a STAT3, la cual se dimeriza, se trasloca al núcleo y estimula la transcripción de los genes diana que median los efectos celulares de la leptina (Schwartz MW, 2000; Harvey y Ashford, 2003).

4.1.3. Funciones de la leptina

Los niveles circulantes de leptina se correlacionan directamente con el contenido de grasa corporal (Argente y cols., 1997). El traspaso de la leptina en el cerebro genera una disminución del apetito y una consecuente pérdida de peso, que se debe, al menos en parte, a la interacción de esta hormona con las estructuras centrales. Por el contrario, la obstrucción de estos mecanismos provoca aumento de ingesta y peso (Barrios y cols., 2007).

Se ha demostrado que el uso de leptina en individuos obesos con leptina no funcional ayuda a la reducción de la grasa corporal (Mantzoros y cols., 2011). Sin embargo, la obesidad común está relacionada con altos niveles de leptina en plasma

(Frederich y cols., 1995; Mantzoros y cols., 2011), lo que indica una resistencia a los efectos de ésta en cuanto a la disminución de la grasa corporal. Estudios en ratones a los que se les sometía a una dieta rica en grasas se observó que estos aumentaban la ingesta energética, posiblemente debido a la resistencia a leptina que desarrollaban (Knight y cols., 2010).

Tras ser secretada por los adipocitos, la leptina es transportada al cerebro a través de la BHE, mediante un sistema de transporte saturable (Banks y cols., 1996) mediado por el receptor ObRa y ejerce su acción anorexigénica en núcleos cerebrales específicos del control de la ingesta, como el núcleo arcuato del hipotálamo, inhibiendo la actividad de las neuronas NPY/AgRP. A su vez, la leptina activa las neuronas POMC/CART del arcuato, produciendo de esta manera una disminución de la ingesta y un aumento del metabolismo basal y del gasto energético (Schwartz y cols., 2000; Mockus, 2001; Moschos y cols., 2002; Horvath, 2005). Estos efectos se pueden ver después de una inyección intracerebroventricular (*icv*) de leptina, sin observar cambios en las concentraciones de leptina circulante, lo que indica la acción central de esta hormona (Halaas y cols., 1997).

Existe una relación directa entre el transporte de leptina en el cerebro y las concentraciones séricas de leptina. Por lo tanto, el transporte de la leptina al cerebro disminuye durante el ayuno, con la caída en los niveles de leptina circulante, mientras que tras la ingesta se produce un aumento paralelo en los niveles séricos de leptina y el transporte del cerebro (Kastin y Pan, 2000). En individuos obesos se produce una reducción en el transporte de la leptina a través de la BHE, lo que contribuye a la resistencia a esta hormona que presentan estos individuos (El-Haschimi y cols., 2000).

Esta adipoquina también está implicada en el desarrollo del hipotálamo. Concretamente participa en el desarrollo de los circuitos neuronales implicados en el control del metabolismo energético (Bouret y cols., 2004). Ratones *ob/ob*, mutantes que carecen del gen que codifica para la leptina, presentan modificaciones tanto en el número de proyecciones como en las conexiones sinápticas a diversas regiones del hipotálamo procedentes de las poblaciones neuronales encargadas del control metabólico, efecto que puede revertirse con la administración de leptina (Bouret y cols., 2004; Pinto y cols., 2004). Bouret y colaboradores, observaron que en ratones *ob/ob* las proyecciones neuronales del núcleo arcuato del hipotálamo estaban alteradas, y que la administración intraperitoneal de leptina promovía el desarrollo de esas proyecciones (Bouret y cols., 2004).

Igualmente, la leptina es importante para el desarrollo de los astrocitos (Udagawa y cols., 2006). Los astrocitos expresan el receptor de leptina (Cheunsuang y Morris, 2005; Pan y cols., 2008) y responden a esta hormona modificando la señal de calcio (Hsuchou y cols., 2009). Además, se ha observado que la expresión del receptor de leptina en estas células se encuentra modificada en ratones obesos (Pan y cols., 2008; Hsuchou y cols., 2009). En estudios realizados en nuestro laboratorio se ha determinado que la exposición central y crónica de leptina induce modificaciones en la longitud de las proyecciones de los astrocitos del núcleo arcuato del hipotálamo y en astrocitos hipotalámicos *in vitro* (García-Cáceres y cols., 2011). Por tanto, la leptina también puede inducir cambios morfológicos sobre estas células gliales en adultos.

La leptina también está relacionada con el metabolismo lipídico y glucídico. Estimula la lipólisis e inhibe la lipogénesis en el hígado y en el tejido adiposo (Hynes G, 2001). Asimismo, inhibe y antagoniza la acción de la insulina y estimula la gluconeogénesis y glucogenolisis (Hynes y Janes, 2001). Por tanto, la leptina participa en el control de la homeostasis energética interviniendo en el metabolismo glucídico y modulando los circuitos hipotalámicos (Schwartz y cols., 1996; Hahn y cols., 1998). Además, esta hormona está implicada en otras múltiples funciones fisiológicas, como en la reproducción, adipogénesis e inmunidad (Friedman y Halaas, 1998).

Otra señal periférica implicada en la regulación de la homeostasis energética, y que es sintetizada principalmente en el estómago, es la ghrelina.

4.2. La ghrelina

A principios de la década de los 80, se sintetizó un grupo de péptidos derivados de la metaencefalina que estimulaban la secreción de la hormona de crecimiento (GH) *in vitro* por células hipofisiarias (Moman y cols., 1981) e *in vivo*, cuando eran administrados tanto oral como parenteralmente (Korbonits y Grossman, 1995). Se les conoce como secretagogos de la GH (GHSs). Más tarde se descubrió que la actividad de los GHSs estaba mediada por un receptor acoplado a proteínas G, el receptor de los secretagogos de GH (GHS-R), expresado principalmente en la hipófisis y en el hipotálamo (Howard y cols., 1996), aunque estudios posteriores confirmaron su presencia en otras regiones cerebrales (Guan y cols., 1997) y en tejidos periféricos (Muccioli y cols., 2007). El GHS-R

formaba parte del grupo de los denominados receptores huérfanos hasta que en el año 1999 se descubrió su ligando endógeno, la ghrelina, purificada inicialmente de las células oxínticas del estómago de rata (Kojima y cols., 1999; Kojima y cols., 2001).

El nombre de ghrelina se basa en la raíz *ghre-*, utilizada en las lenguas indoeuropeas para *crecer*, en referencia a su capacidad para estimular la liberación de GH.

4.2.1. Estructura de la ghrelina

La ghrelina es un péptido acilado de 28 aminoácidos, con un peso molecular de 3,3 KDa. Es producido principalmente en las células oxínticas de la mucosa del estómago (Kojima y cols., 1999; Nakazato y cols., 2001; Van der Lely y cols., 2004), aunque posteriormente se ha confirmado su expresión en multitud de tipos celulares, tanto en el cerebro como en los tejidos periféricos, como hipotálamo, hipófisis, placenta, pulmón, riñón o testículos (Kojima y cols., 1999; Caminos y cols., 2003; Korbonits y cols., 2004; Van der Lely y cols., 2004).

El gen de la ghrelina (GHRL) se localiza en humanos en el cromosoma 3q25-26 y está compuesto por 5 exones y 3 intrones, cuya transcripción da lugar a un prepro péptido de 117 aminoácidos, que contiene un péptido señal de 23 aminoácidos y la proghrelina, un péptido de 94 aminoácidos que tras ser proteolizado da lugar a la ghrelina (Kojima y cols., 1999; Tanaka y cols., 2001) (Figura 11).

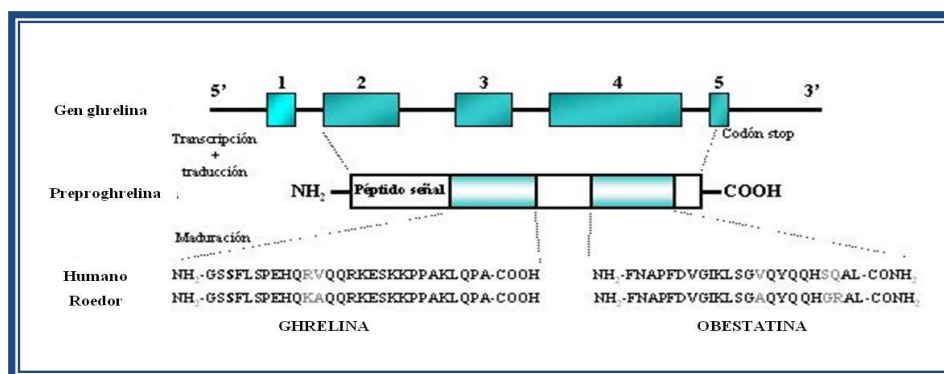


Figura 11. Estructura del gen de la ghrelina y sus productos transcripcionales.

La ghrelina se presenta en forma acilada y desacilada, en función de la presencia o no de una n-octanoilación en el residuo 3 de serina (Bednarek y cols., 2000), responsable del efecto estimulador de la ghrelina en la secreción de GH en la hipófisis (Kojima y cols., 1999; Muccioli y cols., 2002). Aproximadamente del 2 al 20% de la ghrelina total circulante

en plasma se encuentra en forma acilada (Hosoda y cols., 2000a; Akamizu y cols., 2005; Nishi y cols., 2005; Sato y cols., 2005) debido a que la vida media de la ghrelina acilada es más corta que la ghrelina desacilada, ya que se metaboliza y pierde su grupo octanoico rápidamente en la circulación (Akamizu y cols., 2005). La enzima ghrelina O-aciltransferasa (GOAT) es la responsable de la octanoilación de la ghrelina, la cual parece ser necesaria para sus acciones vía el receptor GHS-R1a (Gutierrez y cols., 2008; Yang y cols., 2008) y parece mediar la acción que ejerce la ghrelina sobre el metabolismo de la glucosa (Delhanty y van der Lely, 2011; Heppner y cols., 2011) (Figura 12). Tanto en la sangre como en el estómago existen enzimas desacilasas, esterasas que eliminan el ácido octanoico de la ghrelina para desacilarla (Salehi y cols., 2004; Qader y cols., 2008).

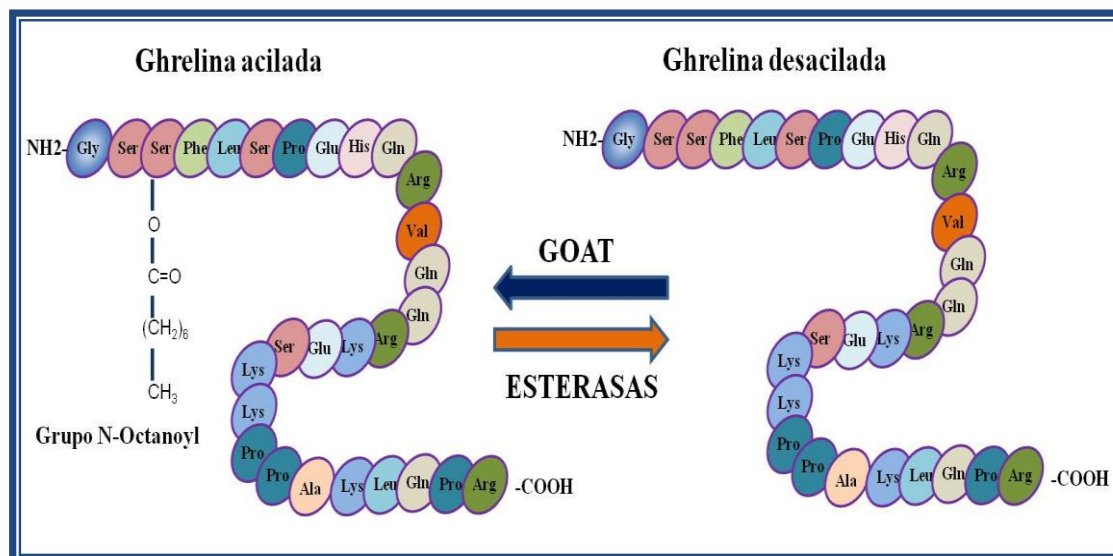


Figura 12. Estructura de la ghrelina en su forma octanoilada en la serina 3 y en su forma desoctanoilada. Esquema del proceso de acilación y desacilación de la ghrelina circulante.

4.2.2. Los receptores de la ghrelina

Los receptores de los secretagogos de GH pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, con 7 dominios transmembrana (Howard y cols., 1996). Se han identificado dos tipos de ADNc de GHS-R, resultado del procesamiento alternativo del gen y que dan lugar a las isoformas del receptor 1a (GHS-R1a), de 366 aminoácidos, 7 regiones transmembrana y una masa molecular de 41 kDa; y a la isoforma 1b (GHS-R1b), constituida por 289 aminoácidos y 5 regiones transmembrana.

El receptor GHS-R1a se expresa predominantemente en el hipotálamo y la hipófisis, consistente con las acciones de la ghrelina sobre el control del apetito, la

ingesta y el balance energético. Asimismo, este receptor se expresa en otras áreas del SNC implicadas en los ritmos biológicos, en memoria y aprendizaje como en el hipocampo, en el área tegmental ventral o en el córtex piriforme (Van der Lely y cols., 2004). En menor proporción se expresa en múltiples órganos periféricos como en la glándula tiroidea, páncreas, bazo, miocardio y glándula suprarrenal (Howard y cols., 1996). La actividad biológica de la isoforma 1b del receptor de ghrelina no está bien determinada (McKee y cols., 1997), aunque se ha encontrado su sobreexpresión en hiperplasias benignas de próstata (Cassoni y cols., 2004), en tumores adrenocorticales (Barzon y cols., 2005) y en hueso humano y osteoblastos (Delhanty y cols., 2006), sin detección de la isoforma GHS-R1a.

En los últimos años, la idea de que la ghrelina podría realizar sus acciones a través de otros subtipos o familias de receptores diferentes ha ido ganando importancia. Además, se ha descubierto que los GHS-R se activan en respuesta a otros ligandos, como la des-Gln14-ghrelina (Hosoda y cols., 2000b), la adenosina y la cortistatina (Deghenghi y cols., 2001; Gauna y van der Lely, 2005).

4.2.3. Funciones de la ghrelina

Dada la presencia del GHS-R en diversos tejidos es esperable que la ghrelina ejerza diferentes funciones. En la periferia, se sabe que tiene efectos sobre múltiples sistemas; sin embargo, son muy destacables sus funciones centrales.

La ghrelina actúa sobre el metabolismo y el balance energético, ejerciendo un efecto estimulador de la ingesta (Nakazato y cols., 2001; Shintani y cols., 2001; Toshinai y cols., 2003) y un efecto reductor del gasto energético, que tienen como consecuencia final un incremento en la ganancia de peso corporal (Tschöp y cols., 2000; Nakazato y cols., 2001) independiente de GH (Tschöp y cols., 2000), para lo cual induce la actividad neuronal en áreas del hipotálamo relacionadas con la regulación de la homeostasis energética. Los niveles plasmáticos de ghrelina están correlacionados negativamente con el porcentaje de grasa y peso corporal, encontrándose disminuidos en individuos obesos (Tschöp y cols., 2001; Soriano-Guillén y cols., 2004; Martos-Moreno y cols., 2011) e incrementados en individuos anoréxicos (Shiyya y cols., 2002; Soriano-Guillén y cols., 2004). Igualmente varían en función del estado nutricional del organismo. En roedores, los niveles circulantes de esta hormona se incrementan en condiciones de ayuno, volviendo a su estado basal tras

la ingesta (Tschöp y cols., 2001). La administración periférica e *icv* de ghrelina favorece un incremento de la ingesta y altera el cociente respiratorio hacia una mayor utilización de carbohidratos sobre las grasas, favoreciendo igualmente un aumento de volumen de tejido adiposo (Tschöp y cols., 2000). Esta hormona también genera efectos a largo plazo sobre el peso, ya que favorece la adipogénesis (Tschöp y cols., 2000) y la hipertrofia del tejido adiposo (Granado y cols., 2010). La ghrelina es capaz de modular la actividad del AMPK, enzima clave en la regulación de la homeostasis energética. Aunque su mecanismo no es del todo conocido, se sabe que la ghrelina y los GHSs promueven la activación de esta proteína en el hipotálamo, incrementando el apetito (Andersson y cols., 2004).

Una vez es secretada por el estómago, la ghrelina accede a través de la BHE al núcleo ARC del hipotálamo, donde actúa sobre las neuronas NPY/AgRP (Hewson y Dickson, 2000; Nakazato y cols., 2001; Wang y cols., 2002), incrementando la expresión de estos neuropéptidos. Estudios electrofisiológicos han demostrado que la ghrelina puede activar las neuronas NPY/AgRP a la vez que reduce la actividad de las neuronas POMC (Cowley y cols., 2003). Además, Cowley y colaboradores demostraron que existe expresión de la ghrelina en una población de neuronas adyacente al tercer ventrículo cerebral que envía proyecciones a las neuronas NPY, AgRP y POMC, estimulando la actividad de las neuronas orexigénicas e inhibiendo la de las anorexigénicas. Esta regulación está mediada por la acción de la AMPK, enzima clave en la regulación del balance energético de las células, detectando la concentración de AMP/ATP en el citoplasma (Kola y cols., 2006), e integrando las señales de los tejidos periféricos y el hipotálamo en respuesta a las concentraciones hormonales y los nutrientes (Long y Zierath, 2006). También se ha demostrado que la ghrelina activa la óxido nítrico-sintasa en el hipotálamo dando lugar a un incremento del apetito (Gaskin y cols., 2003).

La ghrelina también se expresa en páncreas (Dezaki y cols., 2008), regulando la función pancreática mediante el control de la liberación de insulina y glucagón. La capacidad de la ghrelina de regular el metabolismo de la glucosa a través de la insulina es otro mecanismo esencial a través del cual media la homeostasis energética. Por tanto, la ghrelina regula la homeostasis energética, interviniendo en el metabolismo glucídico y modulando los circuitos hipotalámicos (Tschöp y cols., 2000; Van der Lely y cols., 2004; Patel y cols., 2006).

Además de participar en el control de la homeostasis energética, se sabe que la ghrelina actúa sobre múltiples sistemas periféricos y, continuamente, se le van atribuyendo nuevas funciones. Controla la motilidad y secreción gástricas, modula el eje gonadotrófico integrando las señales reproductoras y homeostáticas, tiene efectos sobre la respuesta inmune, acciones sobre el sistema cardiovascular y sobre el metabolismo energético en el hígado y músculo (Wren *et al.*, 2000; Muccioli *et al.*, 2007). Asimismo, la ghrelina incrementa la síntesis de GH en las células somatotrofas y estimula su secreción tanto en animales como en humanos (Kojima *et al.*, 1999). También ejerce efecto sobre la supervivencia celular y la remodelación sináptica (Frago *et al.*, 2002; Frago *et al.*, 2005; Chen, Xing *et al.*, 2011).

Aunque inicialmente se pensó que la forma no acilada de la ghrelina era inactiva, actualmente se sabe que ejerce diferentes funciones, probablemente a través de su interacción con otras isoformas del GHSR o con otros receptores aún desconocidos (Asakawa *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Gauna *et al.*, 2005). Cada vez está más aceptado que la forma desacilada de esta hormona ejerce un papel sobre balance energético (Asakawa *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Además, se ha observado que ejerce otras acciones biológicas no endocrinas, participando en la proliferación y el metabolismo de cardiomiocitos, adipocitos, miocitos y mielocitos (Bedendi *et al.*, 2003; Cassoni *et al.*, 2004; Muccioli *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004; Filigheddu *et al.*, 2007).

A pesar del amplio conocimiento sobre esta hormona, aún se sabe poco acerca de su efecto sobre los astrocitos. Estas células gliales expresan receptores para la ghrelina (Dixit *et al.*, 2006), pero se desconoce su función fisiológica.

II. HIPÓTESIS

Los astrocitos hipotalámicos desempeñan una función relevante en la adaptación del organismo a cambios nutricionales, respondiendo a señales metabólicas como la leptina y la ghrelina.

III. OBJETIVOS

Objetivo 1. Analizar el posible dimorfismo sexual en la respuesta metabólica a la malnutrición neonatal, así como a la introducción de una dieta rica en sacarosa en la etapa adulta.

Objetivo 2. Comparar el efecto de la sobrenutrición neonatal sobre el metabolismo en respuesta a una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta y en respuesta a una dieta rica en sacarosa desde el destete.

Objetivo 3. Estudiar el efecto central de la sobrenutrición neonatal y de una dieta rica en sacarosa, analizando los cambios en los transportadores de glucosa y de glutamato en los astrocitos hipotalámicos.

Objetivo 4. Investigar el efecto de la ghrelina y la leptina sobre los transportadores de glucosa y de glutamato en el hipotálamo.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MODELOS EXPERIMENTALES

1.1. Modelos de experimentación *in vivo*

Todos los experimentos se han realizado de acuerdo con las Normas de Ética en Investigación con Animales dictadas por la Unión Europea y todos los estudios fueron aprobados por el comité ético local (Real Decreto 1201/2005, Boletín Oficial del Estado nº 252). En todos ellos se procuró utilizar el menor número de animales.

Se emplearon ratas Wistar alimentadas con una dieta estándar *ad libitum* suministrada por Panlab (Barcelona, España), que contenía 16,1% de proteínas, 3,1% de grasas, 60% de carbohidratos y 2,9 kilocalorías/gramo (Kcal/g). Las ratas se mantuvieron en condiciones constantes de luz (ciclos de 12 horas de luz-oscuridad) y temperatura (22-24 °C). En los modelos experimentales de infusión crónica de ghrelina y leptina intracerebroventricular (*icv*) y en el primer experimento de modificación del tamaño de camada se emplearon ratas procedentes de Harlan (Harlan Interfauna Ibérica S.A., Barcelona, España) y se mantuvieron y sacrificaron en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid. En los siguientes experimentos de modificación del tamaño de camada así como en el modelo de ayuno se utilizaron ratas criadas y mantenidas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba.

1.1.1. Modificación del tamaño de camada durante el periodo de lactancia

En los siguientes experimentos se alteró la disponibilidad de nutrientes durante el período de lactancia mediante la modificación del tamaño de la camada durante este período, desde el nacimiento hasta el destete, el día postnatal 21. Para ello, en el primer experimento realizado, en el día de nacimiento las camadas se ajustaron a un total de 4, 12 ó 20 crías por madre (4CM, 12CM ó 20CM, respectivamente), realizándose *cross-fostering*, con el mismo número de machos y hembras en cada camada. En los experimentos posteriores se generaron camadas de 4 ó 12 crías con el mismo número de machos y hembras, centrando el análisis en el estudio de la sobrenutrición neonatal en machos. Esta organización en camadas se mantuvo hasta el momento del destete. De este modo, las crías procedentes de las camadas de menor tamaño (4CM) tuvieron una mayor disponibilidad de nutrientes y las procedentes de camadas de mayor tamaño (20CM) tuvieron una menor disponibilidad de nutrientes durante la lactancia con respecto a las crías procedentes de camadas control (12CM).

Posteriormente, a las ratas se les administró una dieta rica en sacarosa, consistente en una solución de sacarosa al 33% en agua, junto a su comida normal de rata. Para ello se empleó azúcar blanco de la marca comercial Azucarera (4 Kcal/g).

1.1.1A. Efecto del sexo en la respuesta a la sobrenutrición y malnutrición neonatal y a una dieta rica en sacarosa

En este experimento (Figura 13) se emplearon ratas Wistar macho y hembra. Las camadas fueron organizadas el día de nacimiento en 4, 12 ó 20 crías/madre y el día postnatal 21 las crías se reorganizaron manteniendo 4 ratas/jaula, con comida y agua *ad libitum*, realizándose un control semanal de peso e ingesta. A las 8 semanas de vida, a la mitad de los animales se les suministró una dieta rica en carbohidratos, sustituyéndose el agua de los biberones por una solución de sacarosa al 33%. De este modo los grupos que surgieron fueron los representados en la Tabla 2.

	MACHOS		HEMBRAS	
	Agua	Sacarosa	Agua	Sacarosa
4 Crías/Madre	4CM (n=8)	4CMS (n=8)	4CM (n=8)	4CMS (n=8)
12 Crías/Madre	12CM (n=6)	12CMS (n=6)	12CM (n=6)	12CMS (n=6)
20 Crías/Madre	20CM (n=10)	12CMS (n=10)	12CM (n=10)	12CMS (n=10)

Tabla 2. Grupos experimentales del modelo experimental de sobrenutrición y malnutrición neonatal y una dieta rica en sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta (Apartado 1.1.1A). CM: crías/madre; n: número animales/grupo; S: Sacarosa.

A todos los animales se les mantuvo con comida y bebida *ad libitum*, realizándose un control semanal del peso y determinándose la ingesta y la bebida diarias una vez por semana hasta el día postnatal 70 (10 semanas de vida), momento en el que se sacrificaron mediante decapitación con una guillotina, entre la primera y segunda vértebras cervicales, entre las 9 y las 11 de la mañana. Se recogió sangre del tronco, que se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a 4 °C para separar el suero, que se recolectó y se guardó a -80 °C hasta su utilización. En estas ratas se analizaron los niveles séricos de diferentes hormonas implicadas en el metabolismo, así como las variaciones de peso, ingesta y bebida entre los diferentes grupos.



Figura 13. Figura representativa del modelo experimental de sobrenutrición y malnutrición neonatal y una dieta rica en sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta (Apartado 1.1.1A).

1.1.1B. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de una dieta rica en sacarosa en ratas macho

Para profundizar en el estudio del efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de una dieta rica en sacarosa se realizaron varios experimentos con camadas de 4 y 12 crías, utilizando sólo las ratas macho para los estudios, ya que el efecto observado en este sexo era mayor y porque, además, en el caso de las hembras, existía una mayor variabilidad en los niveles de hormonas metabólicas, lo que podía ser debido a los cambios estrales de las mismas.

En este experimento se comparó la respuesta de la ingesta de una dieta rica en sacarosa durante dos semanas en la edad adulta y una dieta rica en sacarosa durante dos meses desde el destete en ratas sobrenutridas durante el período neonatal y ratas control. Tras el destete de ratas macho mantenidas en camadas de 4 y 12 crías, las ratas se reorganizaron manteniendo 4 ratas /jaula y se separaron en 2 subgrupos en función del momento en el que se introdujo la dieta rica en sacarosa.

1.1.1B1. Dieta rica en sacarosa 1: Dos semanas de dieta rica en sacarosa, desde el día postnatal 60 hasta el sacrificio (día postnatal 75)

Hasta el día postnatal 60 las ratas se alimentaron con comida normal de rata y agua *ad libitum*. En ese momento, a la mitad de las ratas se les sustituyó el agua por la solución de sacarosa al 33%. Se mantuvieron con comida y bebida *ad libitum* hasta el momento de sacrificio por decapitación el día postnatal 75, tras 12 horas de ayuno (Figura 14).

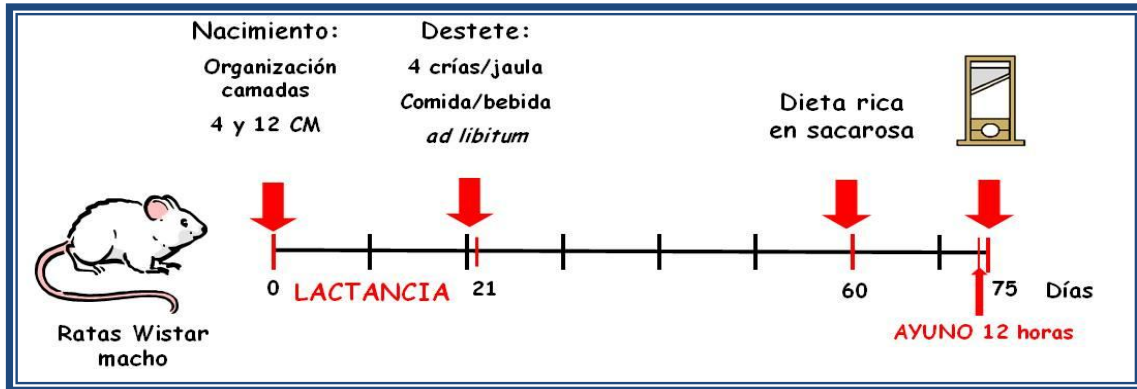


Figura 14. Figura representativa del modelo experimental de sobrenutrición neonatal y una dieta rica en sacarosa de 2 semanas en la etapa adulta en machos (Apartado 1.1.1B1).

Esto resultó en los grupos experimentales mostrados en la tabla 3.

MACHOS	Agua	Sacarosa
4 Crías/Madre	4CM (n=8)	4CMS (n=8)
12 Crías/Madre	12CM (n=12)	12CMS (n=12)

Tabla 3. Grupos experimentales del modelo experimental de sobrenutrición neonatal y una dieta rica en sacarosa de 2 semanas en la etapa adulta en machos (Apartado 1.1.1B1). CM: crías/madre; n: número animales/grupo; S: Sacarosa.

1.1.1B2. Dieta rica en sacarosa 2: Dos meses de dieta rica en sacarosa, desde el destete (día postnatal 21) hasta el sacrificio (día postnatal 75)

Desde el momento del destete de ratas macho de camadas de 4 ó 12 crías, a la mitad de las ratas se les administró una solución de sacarosa al 33% en vez de agua. Se mantuvieron desde este momento y hasta el sacrificio (PND 75) con comida y bebida *ad libitum*. A cuatro ratas por grupo se les perfundió transcárdialmente y el resto se sacrificaron por decapitación tras 12 horas de ayuno (Figura 15).



Figura 15. Figura representativa del modelo experimental de sobrenutrición neonatal y una dieta rica en sacarosa durante 2 meses en machos (Apartado 1.1.1B2).

Esto resultó en los grupos experimentales mostrados en la tabla 4.

MACHOS	Agua	Sacarosa
4 Crías/Madre	4CM (n= 16)	4CMS (n= 12)
12 Crías/Madre	12CM (n= 24)	12CMS (n= 24)

Tabla 4. Grupos experimentales del modelo experimental de sobrenutrición neonatal y una dieta rica en sacarosa durante 2 meses en machos (Apartado 1.1.1B2). CM: crías/madre; n: número animales/grupo; S: Sacarosa.

En ambos grupos las ratas se pesaron semanalmente y se determinó la ingesta diaria una vez por semana desde el destete hasta el sacrificio. Una vez que comenzó el tratamiento con sacarosa, también se controló la cantidad diaria de líquido ingerido.

Se recogieron los cerebros, el tejido adiposo subcutáneo y visceral y el músculo sóleo. Los tejidos se pesaron y se congelaron en hielo seco para posteriormente almacenarse a -80 °C hasta su procesamiento. En el caso de las perfusiones, los cerebros se mantuvieron en solución fijadora durante 24 horas y, tras ser lavados con PB, se mantuvieron a -20 °C en solución crioprotectora, hasta su posterior utilización. Se recogió sangre del tronco, que se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a 4 °C para separar el suero, que se recolectó y se guardó a -80 °C hasta su utilización. Se realizaron análisis de diferentes proteínas y ARNm en el hipotálamo por *Western blotting* (WB) y *RT-PCR*, respectivamente. Los cerebros perfundidos se utilizaron para realizar la inmunohistoquímica de GFAP y la grasa visceral fue utilizada para realizar una tinción con hematoxilina-eosina y realizar el análisis de la morfología de los adipocitos.

1.1.2. Tratamiento central y crónico de ghrelina o leptina

Para la realización de ambos experimentos se emplearon ratas Wistar macho, adultos jóvenes, de 250 gramos aproximadamente (experimento ghrelina: n= 12 /grupo; experimento leptina: n= 6 /grupo).

Tras dos semanas de acondicionamiento en el animalario, las ratas se anestesiaron para la implantación de minibombas osmóticas. Las ratas se anestesiaron con una solución de ketamina (0,08 ml/100g de peso de la rata) (Imalgène 1000. Merial. Lyon, Francia) y xilacina (0,04 ml/100g de peso de la rata) (Rompun. Bayer. Kiel, Alemania) por inyección intraperitoneal. Las minibombas se colocaron mediante el empleo de un estereotáxico Kopft, colocando la barra de los dientes incisivos en la posición de -3,5 mm. Después de rasurar y limpiar la zona con etanol, se realizó una incisión con bisturí en el cuero cabelludo y se practicó una trepanación longitudinal en el cráneo con una broca, implantándose el infusor de la minibomba en el ventrículo lateral de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas del atlas de Paxinos y Watson (**Paxinos y Watson, 1986**): 0,08 mm posterior y 0,16 mm lateral al Bregma. Tras la apertura de un canal subcutáneo en la zona superior de la espalda se colocó la minibomba con unas pinzas de hemostasia. Seguidamente se desplazó la cánula de la bomba de forma que el infusor de la misma quedara en contacto con el orificio hecho en el cráneo. Finalmente, se añadió cemento dental para evitar el desplazamiento del infusor y se suturó la piel de la cabeza con seda trenzada. La bomba empleada fue una mini-bomba osmótica procedente de Alzet Durect Co. (Cupertino, CA, Estados Unidos), que tenía una velocidad de infusión de 12 μ l/día. Las minibombas infundían 5 μ g/día de ghrelina (Anaspec, Inc., San José, CA, Estados Unidos), 15 μ g/día de leptina (Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, MO, Estados Unidos) o de salino (control). El tratamiento se prolongó 14 días, durante los cuales se realizó un seguimiento diario del peso y de la ingesta. El día 14 de tratamiento las ratas se sacrificaron por decapitación, procediendo de la misma manera que en los experimentos anteriormente descritos (Figura 16).

En el experimento de administración central y crónica de ghrelina se realizaron dos grupos de ratas tratadas con ghrelina, un grupo con acceso a la comida *ad libitum* y otro sometido a una restricción de la ingesta, limitándola a la cantidad consumida por los controles, denominado grupo ghrelina *pair-fed*.

Los cerebros se extrajeron y congelaron en hielo seco para posteriormente almacenarse a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento. Igualmente, se recogió sangre del tronco, que se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para separar el suero, que se recolectó y guardó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

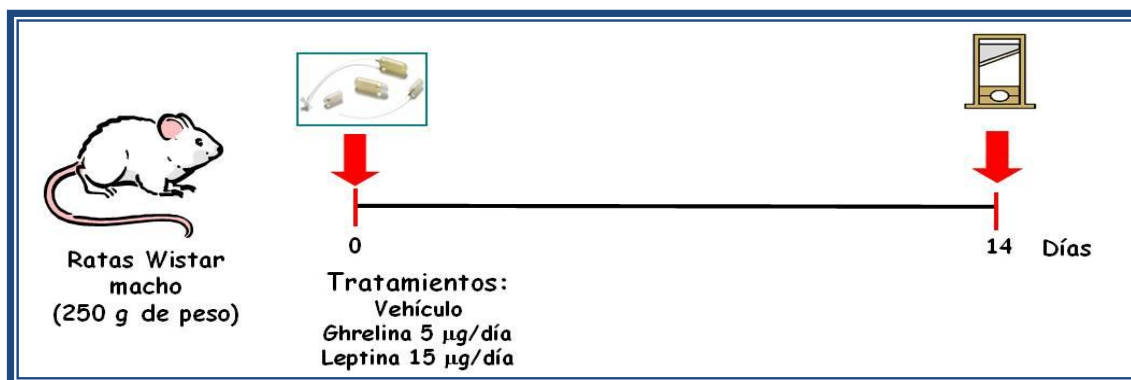


Figura 16. Figura representativa de los modelos experimentales de tratamiento central y crónico con vehículo, ghrelina o leptina.

1.1.3. Tratamiento central y agudo de ghrelina

La implantación de las cánulas *icv* se realizó del mismo modo descrito anteriormente, salvo que en este caso sólo se implantaron las cánulas, por lo que no fue necesaria la apertura del canal subcutáneo en la zona superior de la espalda, sino que tras realizar el orificio en el cráneo éste se selló, dejando el infusor de la cánula en el exterior, para poder acceder a él y realizar los tratamientos. Tras la operación, se mantuvo a las ratas durante 24 horas en jaulas individuales para favorecer su recuperación. Posteriormente se les administró 7 µl del tratamiento mediante una microjeringa de Hamilton Co (Reno, NV, Estados Unidos), resultando en un grupo control ($n=12$), al que se le inyectó solución salina *icv*, y un grupo tratado con ghrelina ($0,4\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$; $n=12$). Una hora después de la administración los animales se sacrificaron por decapitación, determinando el peso y los niveles de glucemia en el momento de la administración del tratamiento y en el momento del sacrificio. El suero y el cerebro fueron extraídos y almacenados hasta su utilización (Figura 17).

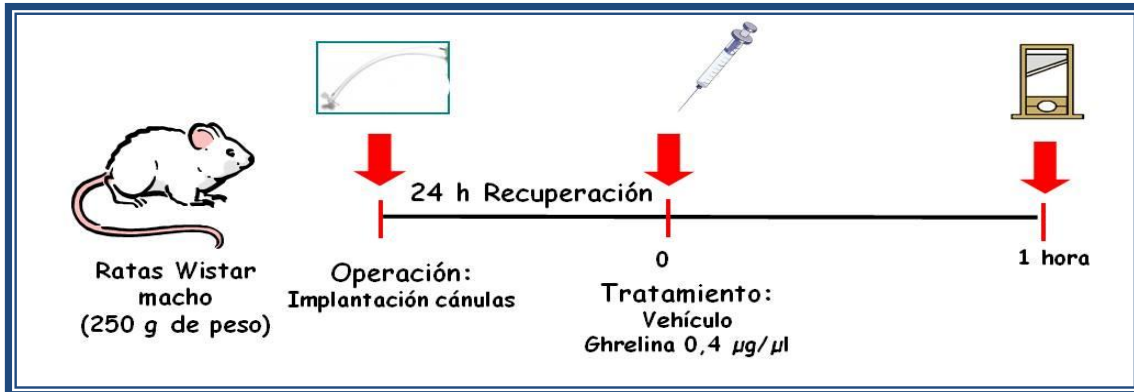


Figura 17. Figura representativa del modelo experimental de tratamiento central y agudo con ghrelina.

1.1.4. Experimento de ayuno

Para generar cambios fisiológicos en los niveles de hormonas metabólicas se realizó un experimento de ayuno. La comida fue retirada de las jaulas de ratas Wistar macho adultas, las cuales fueron sacrificadas 12 ó 24 horas después de la retirada del pienso. El grupo control tuvo comida *ad libitum* hasta el momento del sacrificio. Un total de 12 ratas por grupo fueron sacrificadas por decapitación (Figura 18). Se recogieron los cerebros, que se congelaron en hielo seco, para posteriormente almacenarse a -80°C hasta su procesamiento, y sangre del tronco, que se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C para separar el suero, que se recolectó y se guardó a -80°C hasta su utilización.

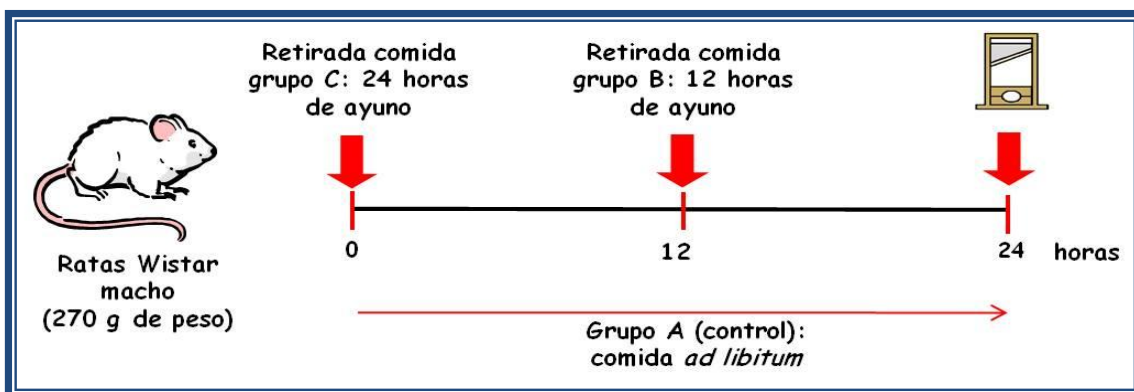


Figura 18. Figura representativa del modelo experimental de ayuno.

1.2. Modelos de experimentación *in vitro*

Para los cultivos celulares los materiales se adquirieron en Falcon (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) y los medios de cultivo en Gibco (Invitrogen Co., Auckland, Nueva Zelanda).

1.2.1. Cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos

Se realizaron cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos procedentes de ratas Wistar macho, criadas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Las ratas se sacrificaron el día postnatal 2 por decapitación. El cerebro se extrajo en condiciones de esterilidad y se conservó en DMEM F-12, conteniendo suero fetal bovino (FBS) 10% (Linus, Madrid, España) y antibióticos 1% (penicilina-estreptomicina) (Gibco). Los hipotálamos se extrajeron y conservaron en un medio bajo en suero (DMEM F-12 + 1% de antibióticos, sin FBS). Posteriormente, fueron disgregados mediante pipetas Pasteur, previamente esterilizadas. Una vez se homogeneizaron los hipotálamos, se centrifugaron durante 7 minutos a 1000 rpm y el pellet obtenido se resuspendió en DMEM F-12 + FBS 10% + antibióticos 1%, utilizando 1 ml de medio por hipotálamo. Posteriormente las células se sembraron en flask de 75 cm³ añadiendo medio de cultivo en proporción 1:10. Los flask se conservaron en un incubador bajo las condiciones de 37 °C y 5% de CO₂ - 95% de aire humidificado, cambiándose el medio de cultivo cada 3 días. Cuando alcanzaron una confluencia del 90% los flask se sometieron a una agitación de 280 rpm, a 37 °C durante 6 horas en un incubador (SI-300, Jeoi Tech, Medline Scientific, Oxon, Reino Unido), para eliminar la microglía y los oligodendrocitos, quedando adheridos en el flask mayoritariamente los astrocitos. Tras eliminar el medio, se procedió a lavar las células dos veces con tampón fosfato salino (PBS) y se suspendieron añadiendo a cada flask 1 ml tripsina 0,05% - ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,02% (Biochrom AG, Berlín, Alemania), con 2 minutos de incubación a 37°C. Después de levantar las células, se neutralizó la tripsina añadiendo medio de cultivo DMEN F-12 + FBS 10% + Ab 1% (proporción 1:10). Tras resuspender las células con la pipeta, se recogieron en un tubo y se centrifugaron durante 5 minutos a 1150 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de DMEN F-12 + FBS 10% + Ab 1%.

Para determinar la concentración de células se utilizó la cámara de Neubauer y se procedió a sembrarlas en placas de poliestireno previamente tratadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de poli-L-lisina (Sigma) para mejorar la adherencia de las células a la placa. Para los estudios por WB se utilizaron placas de 60 x 15 mm (p60), sembrando $4,35 \times 10^5$ células/placa. Para los estudios por *RT-PCR* se emplearon placas de 100 x 20 mm, sembrando 10^6 células/placa. Para los estudios de inmunofluorescencia se emplearon placas de 24 pocillos, sembrando 2×10^4 células/pocillo. Las células se dejaron crecer durante 24 horas en medio DMEN F-12 + FBS 10% + Ab 1%. Posteriormente, se lavaron 2 veces con PBS para eliminar cualquier resto del medio anterior, añadiendo finalmente DMEM F-12 + antibióticos 1% (sin FBS). Veinticuatro horas después se retiró el medio y se añadieron los tratamientos, preparados en DMEM F-12 + antibióticos 1% (2 ml para las placas p60, 5 ml para las p100 y 1 ml para cada pocillo de las p24) (Figura 19).

Tratamientos

Los tratamientos realizados sobre estas células fueron los que siguen:

- Ghrelina: Las células se trataron con ghrelina de rata, 331,32 ng/ml (100 nM) (Anaspec) o vehículo durante 24 horas.
- Leptina: Las células se trataron con leptina de rata, 100 ng/ml, (National Hormone & Pituitary Program) o vehículo durante 24 horas.

Para determinar la dosis a emplear de ambas hormonas y el tiempo de exposición a las mismas, se realizó una curva dosis-tiempo/respuesta.

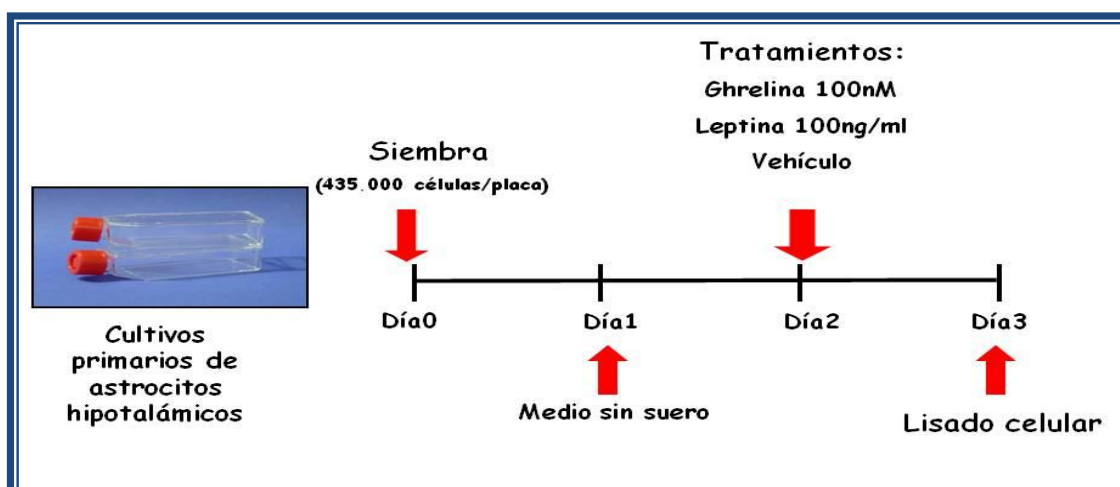


Figura 19. Figura representativa del modelo experimentales *in vitro* en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos.

1.2.2. Cultivos de la línea celular RCA-6

Se empleó la línea de neuronas RCA-6, que son neuronas hipotalámicas fetales de rata, transformada con virus SV40, cedida por el Dr. I. Torres-Alemán (Instituto Cajal, Madrid, España).

Los cultivos se mantuvieron en placas de poliestireno p100 con medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) con 4,5 g/l de D-glucosa, sin rojo fenol, suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10% (Linus, Cultek SLU, Madrid, España), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y L-glutamina 2 mM, en incubador a unas condiciones de 37 °C y 5% de CO₂ - 95% de aire humidificado (Rasmussen y cols., 1990).

Para los experimentos, las células que crecieron en p100, cuando alcanzaron la confluencia del 80% se suspendieron utilizando 1 ml tripsina 0,05% - EDTA 0,02% y se sembraron en placas p60 (2 x 10⁵ células/ placa), permitiendo su expansión durante 72 horas en medio de crecimiento. A continuación, se diferenciaron durante 48 horas en DMEM F-12 suplementado con 1,2 g/l de NaHCO₃, HEPES 15 mM y L-glutamina 2mM, sin rojo fenol, al que se añadieron los siguientes factores específicos: transferrina 0.1 mg/ml, putrescina 10⁻⁵ M, progesterona 10⁻⁸ M, corticosterona 10⁻⁷ M, 3,3',5'-triiodo-L-tironina sódica 10⁻⁵ M, ácido araquidónico 1 µg/ml y selenito sódico 2x10⁻⁸ M (Rasmussen y cols., 1990) (Figura 20).

Tratamientos

Los tratamientos utilizados en esta línea celular fueron los que siguen:

- a) Ghrelina: las células se trataron con ghrelina de rata, 165,6 ng/ml (50 nM) (Anaspec) o vehículo durante 24 horas.
- b) Leptina: las células fueron tratadas con leptina de rata, 10 ng/ml (National Hormone & Pituitary Program) o vehículo durante 24 horas.

Para determinar la dosis a emplear de ambas hormonas y el tiempo de exposición a las mismas, se realizó una curva dosis-tiempo/respuesta.

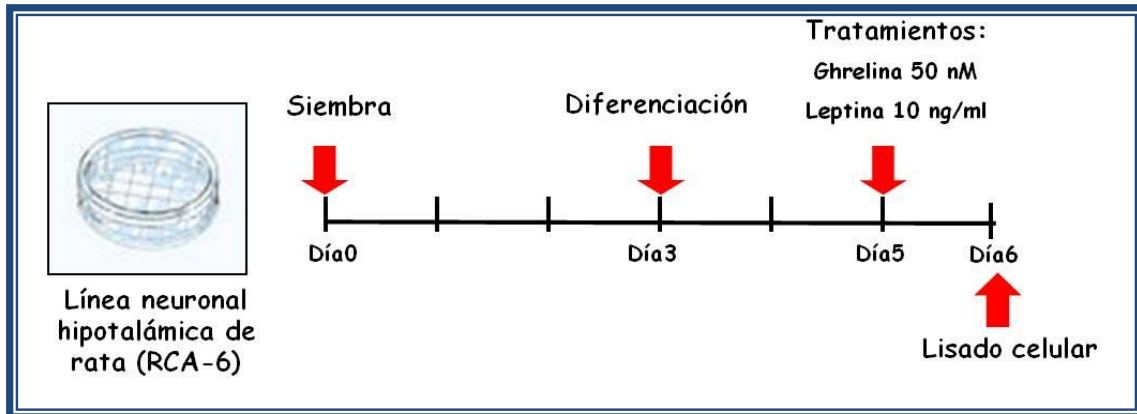


Figura 20. Figura representativa del modelo experimental *in vitro* en la línea neuronal hipotalámica de rata RCA-6.

1.2.3. Cultivos de la línea celular C6

Se empleó la línea celular de astrocitoma de rata C6, originalmente derivada de un tumor cerebral de rata inducido por N-nitrosometilurea (Benda y cols., 1968), cedida por el Dr. Luis Miguel García Segura (Instituto Cajal, Madrid, España).

Los cultivos se mantuvieron en placas de poliestireno p100 con medio RPMI (Biochrom) con 2,0 g/l de NaHCO_3 , sin rojo fenol, suplementado con FBS 10% (Linus, Cultek SLU), penicilina 100 U/ml, estreptomycinina 100 $\mu\text{g/ml}$ y L-glutamina 2 mM, en incubador a unas condiciones de 37 °C y 5% de CO_2 - 95% de aire humidificado (Rasmussen y cols., 1990). Para los experimentos, las células que crecieron en p100, cuando alcanzaron la confluencia del 80% se suspendieron utilizando 1 ml tripsina 0,05% - EDTA 0,02% y se sembraron en placas p100 (2×10^6 células/ placa), permitiendo su expansión durante 72 horas en medio de crecimiento. A continuación, se diferenciaron durante 48 horas en RPMI suplementado con 2,0 g/l de NaHCO_3 , penicilina 100 U/ml, estreptomycinina 100 $\mu\text{g/ml}$, L-glutamina 2mM, APMc 100mM, sin rojo fenol y sin suplementarlo con FBS, para, posteriormente, proceder a los tratamientos (Figura 21).

Tratamientos

Los tratamientos utilizados en esta línea celular fueron los que siguen:

- a) Ghrelina: las células se trataron con ghrelina de rata, 331,2 ng/ml (100 nM) (Anaspec) o vehículo durante 24 horas.

b) Leptina: las células fueron tratadas con leptina de rata, 100 ng/ml (National Hormone & Pituitary Program) o vehículo durante 24 horas.

Para determinar la dosis a emplear de ambas hormonas y el tiempo de exposición a las mismas, se realizó una curva dosis-tiempo/respuesta.

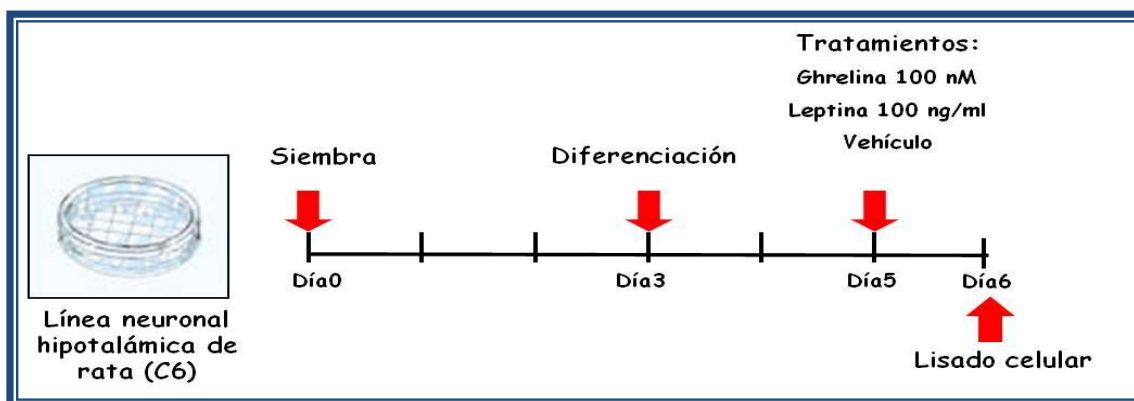


Figura 21. Figura representativa del modelo experimental *in vitro* en la línea celular de astrocitoma de rata, C6.

2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Los reactivos generales, de grado analítico, fueron de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) o Sigma-Aldrich, Inc. (Saint Louis, MO, Estados Unidos), salvo los que se indican a continuación.

2.1. Perfusión transcárdial

La fijación de los tejidos *in vivo* se realizó mediante perfusión transcárdial. Las ratas recibieron anestesia con una inyección intraperitoneal de pentobarbital (1mg/kg) (Braun Vetcare, Barcelona, España) y se perfundieron por vía transcárdial con una solución de paraformaldehído al 4% en PB pH 7,4, mediante el uso de una bomba de perfusión (Easy-Load, Masterflex, IL, Estados Unidos).

Posteriormente, se extrajeron los cerebros y se mantuvieron en la solución de fijación durante 24 horas a 4 °C. Tras 3 lavados con PB, los cerebros perfundidos se conservaron a -20 °C en una solución crioprotectora (30% sacarosa, 30% etilen-glicol, en PB) hasta su posterior utilización.

2.2. Disección del hipotálamo

Para los estudios de WB o *PCR* en tiempo real, el hipotálamo se diseccionó realizando varios cortes (Glowinski e Iversen, 1966):

- Corte posterior al hipotálamo y anterior a los cuerpos mamilares, eliminando el rombencéfalo.
- Dos cortes sagitales que delimitan los laterales del hipotálamo.
- Corte anterior al hipotálamo, a la altura del quiasma óptico.
- Corte dorsal a la altura de la comisura anterior.

2.3. Análisis proteico

2.3.1. Obtención de la fracción proteica total

Obtención de la fracción proteica total de los hipotálamos

Para el análisis por *Western Blotting*, una vez extraídos los hipotálamos se homogenizaron en 500 μ l de tampón de lisis: tampón fosfato sódico (0.1 M, pH 7.4) con Triton X-100 1 %, dodecil sulfato sódico (SDS) 0.1 %, azida sódica 0.5 %, EDTA 2 mM, deoxicolato sódico 0.5 %, PMSF 1 mM y un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, GmbH) y se incubaron 24 horas a -80 °C. Posteriormente, los lisados se centrifugaron 20 minutos a 14000 rpm y 4 °C. Los sobrenadantes resultantes constituyeron la fracción proteica total y se congelaron a -80 °C hasta su utilización.

Obtención de la fracción proteica total de los cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos

Para el análisis por WB, tras los correspondientes tratamientos realizados sobre las células, las placas se lavaron 2 veces con PBS. Para recoger las células se añadieron 200 μ l de buffer de lisis en cada placa, conteniendo 25mM HEPES, 150mM KCl, 2mM of EDTA, 0.1% Igepal, 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 10 μ M benzamidina y leupeptina y 0.5 mM DTT. Las células se congelaron a -80 °C durante 24 horas. A continuación, se centrifugaron 20 minutos a 14000 rpm y 4 °C, recogiendo los sobrenadantes, para posteriormente congelar a -80 °C durante toda la noche. Finalmente, se procedió a la liofilización de las muestras (Cryodos. TELSTAR. Tarragona, España), para tras 24 horas resuspender

el producto de la liofilización en 40 µl de agua estéril. Hasta su utilización se congelaron a -80 °C.

Obtención de la fracción proteica total de los cultivos de la línea neuronal hipotalámica RCA-6

Tras los correspondientes tratamientos de las células, las placas p60 se lavaron 2 veces con PBS y a continuación se añadieron 200 µl de tampón de lisis por placa (mismo buffer que el utilizado para la lisis de los hipotálamos). Se recogieron las células y se congelaron a -80 °C durante 24 horas. Posteriormente, se centrifugaron 20 minutos a 14000 rpm y 4 °C, recogándose los sobrenadantes, que constituyeron la fracción proteica total. Hasta su utilización se congelaron a -80 °C.

2.3.2. Separación de las proteínas de membrana en la línea celular C6

Para el aislamiento de las proteínas de la membrana plasmática se empleó el kit Qproteome Plasma Membrane (QIAGEN Iberia. Madrid, España) y se siguieron las indicaciones del fabricante, partiendo de 1×10^7 células por cada columna.

Las células, crecidas en p100 e incubadas con los correspondientes tratamientos, se recogieron en 5 ml/placa p100 de PBS con raspadores. Brevemente, se lisaron las células mediante el buffer de lisis (administrado por el proveedor) y se centrifugaron durante 20 minutos a 12.000 rpm a 4 °C para llevar a cabo su fraccionamiento y disrupción celular. El sobrenadante obtenido constituyó la fracción proteica total, de la cual se recogieron 50 µl, que se liofilizaron y resuspendieron en 15 µl de H₂O purificada para posteriormente ser congelada y almacenada a -80 °C hasta su procesamiento. Al resto del sobrenadante, tras la adición de un ligando de unión aportado por el fabricante, se le añadió un equilibrado de cuentas magnéticas para favorecer la unión de las proteínas de membrana. Tras sucesivas centrifugaciones en buffer de lisis y, posteriormente, en tampón de lavado, se eliminaron las cuentas magnéticas, aislando las proteínas de membrana. Por último, se añadieron 4 volúmenes de acetona y se realizó una centrifugación final (10 minutos a 12.000 rpm, 4 °C), descartando el sobrenadante y reconstituyendo el pellet en 15 µl de H₂O₂ purificada, almacenándose a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

Para el procesamiento de las muestras, tanto las correspondientes a la fracción proteica total como a las proteínas de membrana, se siguió el protocolo de análisis proteico mediante WB.

2.3.3. Cuantificación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas en las muestras se cuantificó mediante el método descrito por Bradford (**Bradford, 1976**), que se basa en el cambio del espectro de absorción de algunos colorantes al interaccionar con las proteínas.

Cada muestra diluida en agua se mezcló con el reactivo de Bradford concentrado (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Estados Unidos) siguiendo las indicaciones del fabricante. La mezcla se agitó y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente, midiendo después su absorbancia a 595 nm con el espectrofotómetro Infinite M200 (TECAN, Salzburgo, Austria). La recta patrón se realizó con concentraciones de 0-25 µg de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma).

2.3.4. Western blotting

Para el análisis proteico de las muestras se realizaron ensayos de WB. Los reactivos y productos necesarios para los análisis por WB, salvo los indicados, se adquirieron en Bio-Rad Laboratories, Inc.

Se partió de las muestras de fracción proteica total procedentes de la lisis de los cultivos celulares o de los hipotálamos de las ratas. Cantidades equivalentes de proteína total, 20, 40 ó 60 µg, se mezclaron con volúmenes iguales de tampón Laemmli 2x (conteniendo Tris-HCl 1M pH 6,8, glicerol 25 %, SDS 2 % y azul de bromofenol 0,01 %) y se desnaturalizaron en un termoblocker (Thermomixer Compact. Eppendorf. Hamburgo, Alemania) durante 5 minutos a 100 °C. Tras una breve centrifugación, las muestras se conservaron en hielo. Posteriormente fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida del 8% al 12% en función de la proteína a estudiar, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), a un voltaje de 80-120 V. Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoro de polivinilo (PVDF) a 350 mA y durante 90 minutos, para la posterior inmunodetección. La eficiencia de la transferencia se comprobó tiñendo las membranas con rojo Ponceau S, ya que esta solución tiñe las bandas de proteína de un color rojo, permitiendo comprobar si las proteínas se han

transferido correctamente. Para eliminar el color y desteñir las membranas se empleó ácido acético al 10%. Posteriormente, las membranas se bloquearon durante 90 minutos a temperatura ambiente y en agitación en tampón de bloqueo (leche desnatada 5% en tampón de lavado: Tris-HCl 10 mM pH 7,4; NaCl 0,1 M, Tween 20 0,1%). Tras el bloqueo, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C y en agitación con los anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo, empleando una dilución 1:1000. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 15 minutos con tampón de lavado y se incubaron 90 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes unidos a la peroxidasa del rábano (HRP), diluidos igualmente en tampón de bloqueo para finalmente lavar de nuevo 3 veces.

Los anticuerpos primarios utilizados para el WB se recogen en la tabla 5:

ANTÍGENO	MARCA	HUÉSPED
Actina	NeoMakers	Ratón
GAPDH	Anaspec	Conejo
GFAP	Sigma-Aldrich	Ratón
GLAST	Alpha Diagnostic	Conejo
GLT-1	Affinity BioReagents	Conejo
GLUT-1	Alpha Diagnostic	Conejo
GLUT-2	Alpha Diagnostic	Conejo
GLUT-3	Alpha Diagnostic	Conejo
GS	USBiological	Ratón
PCNA	Santa Cruz	Ratón
Vimentina	Sigma-Aldrich	Ratón

Tabla 5. Anticuerpos primarios empleados para el Western Blotting. GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; GLAST: transportador de glutamato aspartato; GLT-1: transportador de glutamato; GLUTs: transportadores de glucosa; GS: glutamina sintetasa; PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación. Compañía de los anticuerpos: NeoMarkers (Fremont, CA, Estados Unidos); Anaspec (San José, CA, Estados Unidos); Alpha Diagnostic (San Antonio, TX, Estados Unidos); Affinity BioReagents (Golden, CO, Estados Unidos); USBiological (Swampscott, MA, Estados Unidos); Santa Cruz (Santa Cruz, CA, Estados Unidos).

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulina G (IgG) de ratón o conejo, conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), de Pierce Biotechnology (Rockford, IL, Estados Unidos), empleándose una dilución 1:2000.

Los ensayos de WB se revelaron por quimioluminiscencia (Perkin Elmer, Inc., Boston, MA, Estados Unidos), sustrato de la HRP. La cuantificación densitométrica de las bandas de inmunoreactividad se efectuó con el programa Kodak Gel Logic 1500 Image Analysis System and Molecular Imaging Software, versión 4.0 (Rochester, NY, Estados Unidos). Todas las membranas se rehibridaron con GAPDH para normalizar cada muestra. De este modo, todos los datos están normalizados con los valores de la proteína control en cada gel. En el análisis proteico del modelo *in vivo* de leptina las normalizaciones se hicieron con rojo Ponceau.

2.4. Análisis de los ARN mensajeros

2.4.1. Obtención y preparación del ARN total

El ARN total se extrajo de los hipotálamos, grasa y células en cultivo empleando el reactivo TRIzol® Reagent (Invitrogen) de acuerdo a las condiciones establecidas por el fabricante. En el caso de los cultivos celulares, tras los correspondientes tratamientos, las placas p100 se lavaron 2 veces con PBS y las células se recogieron en 1 ml de Tri-Reagent. A los hipotálamos y a la grasa se les añadió 1 ml de Tri-Reagent.

Todas las muestras de ARN se trataron con ADNasaI libre de ARNasa (Sigma) para eliminar cualquier resto de ADN genómico. El ARN así obtenido se cuantificó espectrofotométricamente mediante el Nanodrop 1000, de Thermo Scientific.

2.4.2. Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR; quantitative Real Time-PCR)

Para la síntesis de ADNc se utilizó 1µg de ARN total. Los ensayos se realizaron mediante kits de Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), los cuales fueron utilizados de acuerdo al protocolo del fabricante en un Peltier Thermal Cycler Tetrad2 (BioRad) para RT-

PCR y se analizaron mediante un ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems).

La reacción de *qRT-PCR* se realizó en un volumen final de 20 μ l conteniendo 9 μ l de ADNc (diluído en agua libre de ARNasa), 1 μ l de 20X TaqMan Gen Expression Assay Mix (Applied Biosystems) y 10 μ l de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems).

El método de $\Delta\Delta C_T$ fue utilizado para la cuantificación relativa, de acuerdo con las pautas del fabricante. Como control de carga utilizamos oligonucleótidos que hibridaban con el ADNc de GAPDH o PGK1. El análisis estadístico se realizó utilizando los valores de $\Delta\Delta C_T$.

Las sondas de expresión utilizadas (Applied Biosystems) se recogen en la tabla 6:

Cebador	Rn
AgRP	01431703
CART	00567382
GAPDH	99999916
GFAP	00566603
GLUT-1	01417099
GLUT-2	00563565
GLUT-3	00567331
NPY	01410145
ObR	01433205
Orexina	00565995
PGK1	00821429
POMC	00595020

Tabla 6. Sondas de expresión empleadas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real (RT). **AgRP:** péptido relacionado con Agouti; **CART:** transcrito relacionado con cocaína y anfetamina; **GAPDH:** gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; **GFAP:** proteína ácida fibrilar glial; **GLUTs:** transportadores de glucosa; **NPY:** neuropéptido Y; **ObR:** receptor de leptina; **PGK1:** fosfoglicerato quinasa 1; **POMC:** pro-opiomelanocortina.

2.5. Obtención de las secciones de tejido

2.5.1. Secciones de cerebros perfundidos

Los cerebros perfundidos y conservados en solución crioprotectora se emplearon para el análisis inmunohistoquímico. Para ello, se realizaron cortes coronales del cerebro de 40 μm en un vibrotomo (Leica VT1200S, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemania). Se recogieron todas las secciones que contenían el núcleo arcuato del hipotálamo, siguiendo el atlas esterotáxico del cerebro de rata de Paxinos (Paxinos y Watson, 1986).

Los cortes fueron conservados en solución crioprotectora a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso para inmunohistoquímica.

2.5.2. Secciones de tejido adiposo visceral

Las muestras de tejido adiposo visceral, congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se atemperaron a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la cámara del criostato (Leica, Madrid, España) durante 45 minutos. Una vez atemperadas, se trabajó con un bloque de tejido adiposo que se adhirió al porta-muestras del criostato mediante un pegamento especial que permite la realización de cortes de tejido a la temperatura óptima (OCT) (Tissue Tek, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, Estados Unidos).

Las secciones de tejido obtenidas, de 15 μm de grosor, se recogieron en portaobjetos (Waldeman Knittel, Alemania) previamente tratados con poli-L-lisina (Sigma), almacenándose a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

2.6. Inmunohistoquímica para proteína ácida fibrilar de glía (GFAP) en el hipotálamo

La inmunohistoquímica se llevó a cabo en flotación, en secciones coronales de cerebro de 40 μm de grosor obtenidas a partir del vibrotomo. Las incubaciones con los anticuerpos y los lavados se realizaron en agitación moderada, utilizando una solución de lavado (Triton X-100 al 0,3 % y BSA al 0,3% en PB). En primer lugar, las secciones se incubaron en solución de lavado con 3% de peróxido de hidrógeno y 30% de metanol, durante 30 minutos a temperatura ambiente para inhibir la actividad peroxidasa endógena del tejido. Se lavaron profusamente con solución de lavado y se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente con tampón de bloqueo (triton X-100 al 3% y

BSA al 3% en PB), para reducir la señal no específica. Seguidamente se incubaron 48 horas con el anticuerpo primario que detectaba la GFAP (Sigma, 1:1000) en solución de lavado con un suplemento de 3% de suero de cabra (NGS). Tras el periodo de incubación con el anticuerpo primario, se realizaron lavados y se incubó el tejido durante 2 horas con el anticuerpo secundario correspondiente unido a biotina (1:1000) a temperatura ambiente. Seguidamente se procedió a lavar tres veces y se añadió el complejo de avidina-biotina peroxidada (ABC 32020; Pierce Biotechnology) diluido 1:500 en solución de lavado con 5% de BSA. El producto de reacción de la peroxidasa se reveló incubando las muestras en una solución de diaminobencidina al 0,03% (DAB; Sigma) y peróxido de hidrógeno al 0,01% en PB. A continuación, las secciones en flotación fueron montadas en portaobjetos previamente cubiertos con poly-L-lisine hydro-bromide (50 µg/ml; Sigma) y, posteriormente, se deshidrataron. Por último, todas las muestras se cubrieron con DEPEX (BDH Laboratory Supplies, Inglaterra) y observadas con un microscopio óptico Leica (DMRB-E, Heidelberg, Alemania).

2.7. Análisis cuantitativo y morfológico de las células GFAP⁺ en el núcleo arcuato del hipotálamo

Para este estudio se utilizaron 5 secciones de 40 µm de grosor por animal distribuidas a lo largo del núcleo arcuato del hipotálamo. Se tomó como coordenadas 2,3 – 3,3 mm del bregma de acuerdo con el atlas esterotáxico del cerebro de la rata realizado por Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1986). Cincuenta campos por animal (área de campo de 19,5 mm²) fueron analizados con el objetivo 40X del microscopio óptico (ZEISS. Thornwood, NY, Estados Unidos). Las imágenes fueron realizadas con una cámara digital (JAI Corporation, modelo CV-S3200, Japón) y procesadas mediante el uso del software Image-Pro Plus versión 5.0 (Media Cybernetics Inc, Silver Spring, MD, Estados Unidos). A continuación, se procedió al contaje del número de células inmunoreactivas para GFAP (GFAP⁺), el número de proyecciones principales (sólo las que partían del soma) que presentaba cada una de ellas y la longitud de las mismas, mediante el uso del programa Image J (National Institutes of Health. Bethesda, MD, Estados Unidos) Todos los estudios cuantitativos y morfométricos se realizaron sin conocer la procedencia de las muestras experimentales.

2.8. Doble inmunocitofluorescencia para GLUT-2 o GLAST y vimentina en cultivos primarios astrocitos hipotalámicos

Se realizaron inmunocitofluorescencias dobles para GLUT-2 y vimentina y GLAST y vimentina, en cultivos de astrocitos primarios hipotalámicos procedentes de ratas Wistar del día postnatal 2. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos sobre láminas cubreobjetos y todo el proceso se realizó en los pocillos de la placa hasta el momento de montar las láminas sobre los portaobjetos.

Los cultivos celulares (en adelante, las muestras) se lavaron con PBS y se fijaron 15 minutos a temperatura ambiente con 4% PFA. Tras lavar y equilibrar en tampón de lavado (PBS 0.1 M, pH 7.4, BSA 0.1%, y Triton-X100 0.1%) durante 15 minutos, las muestras se bloquearon con tampón de bloqueo (PBS 0.1 M, pH 7.4, BSA 3%, y Triton-X100 1%). A continuación, se añadieron los anticuerpos primarios correspondientes a las muestras, GLUT-2 o GLAST (Alpha Diagnostic) y vimentina (Sigma), a una concentración 1:1000, y se incubaron durante 48 horas a 4 °C.

Tras este período, se lavaron y se incubaron 90 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con distintos fluorocromos en una dilución 1:1000. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón o conejo conjugados con Alexa-Fluor-488 o Alexa-Fluor-633 (Molecular Probes. Eugene, OR, Estados Unidos). Por último, y tras lavar nuevamente, se montaron las láminas con las células sobre los portaobjetos con medio de montaje.

Las microfotografías se realizaron con un microscopio confocal de fluorescencia (Leica, Madrid, España), utilizando unas longitudes de onda de excitación de 495 nm y 632 nm para los fluorocromos Alexa-Fluor-488 y Alexa-Fluor-633, respectivamente.

Para identificar las concentraciones óptimas de los distintos anticuerpos empleados se realizaron previamente diferentes pruebas de concentración, eligiendo concentraciones que presentaban un marcaje específico y que mostraron el menor fondo inespecífico. En cada ensayo se incluyeron controles negativos, los cuales carecían de inmunofluorescencia.

2.9. Análisis histológico del tejido adiposo visceral

Tras colocar los portaobjetos en un cestillo, este se introdujo en una cubeta con formol tamponado al 10% para proceder a la fijación de las secciones de tejido visceral durante 15 minutos. Tras un lavado rápido con agua, el cestillo se introdujo en una cubeta con hematoxilina (Panreac. Barcelona, España) durante 10 minutos y, posteriormente, se lavaron los portas con agua caliente, para eliminar el exceso de tinción. A continuación se introdujo el cestillo en la cubeta con eosina acuosa (Leica) durante un minuto y se eliminó el exceso con agua. Posteriormente, se deshidrataron los cortes introduciendo el cestillo en cubetas con alcoholes (70°, 96°, 100°) durante 1 minuto en cada una de ellas y aclarando con xilol durante 3 minutos. Finalmente, se montó el portaobjetos con el medio de montaje Depex (BDH Laboratory Supplies. Poole, Inglaterra) colocando encima un cubreobjetos. Una vez seco el medio de montaje se procedió a la observación del portaobjetos al microscopio óptico.

Las secciones de tejido visceral se analizaron con el objetivo de 40X del microscopio óptico (ZEISS). Las imágenes se realizaron con una cámara digital y se procesaron mediante el uso del software Image-Pro Plus. A continuación se procedió al análisis del perímetro de los adipocitos. Para ello, se realizaron 6 fotografías aleatorias de cuatro secciones diferentes de cada animal. En cada fotografía se analizaron 6 células (144 adipocitos/rata). Se calculó el perímetro medio de los adipocitos por animal (n=4) para, posteriormente, determinar el valor medio del perímetro de estas células por grupo experimental.

2.10. Determinación de la glucemia en sangre y determinaciones bioquímicas en plasma

En los experimentos en los que se determinó la glucemia se empleó el glucómetro y tiras reactivas ACU-Chek (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemania), obteniéndose la sangre mediante punción de la vena lateral de la cola.

2.10.1. Radioinmunoensayo (RIA) para la determinación de los niveles séricos de ghrelina total y acilada y corticosterona

Los niveles de ghrelina total y acilada presentes en el suero de los animales se determinaron mediante un radioinmunoensayo, siguiendo las instrucciones del fabricante (Linco Research, St Charles, MO, Estados Unidos, en el caso de los

ensayos de ghrelina; ImmuCgem Double Antibody, MP Biomedicals, Orangeburg, NY, Estados Unidos, en el caso del ensayo de corticosterona).

Estos ensayos se realizan mediante un antígeno marcado radiactivamente, el trazador, el cual se une al anticuerpo correspondiente desplazando al antígeno no marcado. Cuanto mayor sea la cantidad de hormona presente en las muestras mayor será la cantidad de trazador libre, que es lo que se detectará y cuantificará en un contador de radiación gamma (Packard, Canberra, Australia).

Para la determinación de los niveles de corticosterona en suero es necesaria una dilución 1:200 de los sueros en buffer fosfo-salino (pH 7,0) con gammaglobulinas de conejo. En los ensayos de ghrelina total y acilada no se requería ninguna dilución previa.

El protocolo que se realizó fue el siguiente. En tubos de borosilicato se realizó la mezcla del tampón de ensayo con las muestras y el anticuerpo, anti-ghrelina, anti-ghrelina acilada o anti-corticosterona. La mezcla se incubó 24 horas a 4 °C para, posteriormente, añadir a los tubos el trazador, marcado con ¹²⁵I. Se incubó durante 24 horas a 4 °C y, finalmente, el último día se añadió el agente precipitante, incubándose durante 20 minutos a 4 °C. Las muestras se centrifugaron a 4750 rpm 20 minutos a 4 °C. Tras retirar los sobrenadantes se midieron las cuentas por minuto presentes en los precipitados en el contador de radiación gamma.

Para el ensayo de ghrelina total, la sensibilidad del método es de 93 pg/ml con unos coeficientes intra- e inter-ensayo de 6,4% y 16,3%, respectivamente. Para el de ghrelina acilada la sensibilidad del método es de 7,8 pg/ml, con unos coeficientes intra- e inter-ensayo de 7,4% y 13,4%, respectivamente. Para el ensayo de corticosterona, la sensibilidad del método es de 7,7 ng/ml con unos coeficientes intra- e inter-ensayo de 7,3% y 6,9%, respectivamente. El límite de linealidad para los métodos es de 6000 pg/ml para el ensayo de ghrelina total, 2000 pg/ml para el ensayo de ghrelina acilada y 1000 ng/ml para el ensayo de corticosterona.

2.10.2. ELISA para la determinación de los niveles séricos de insulina, leptina y adiponectina

Para la determinación de los niveles de estas hormonas en suero se procedió siguiendo las indicaciones del fabricante (Millipore Research, St. Charles, MO, Estados Unidos).

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos, donde a cada pocillo se añadió tampón de ensayo y la muestra correspondiente. En el caso de adiponectina, los sueros se diluyeron 1:500 en tampón de ensayo, según las indicaciones del fabricante. En los ensayos de leptina e insulina no fue necesaria la dilución de los sueros.

Para el ensayo de leptina y de adiponectina se realizó una incubación de 2 horas de los sueros con el tampón de ensayo a temperatura ambiente y en agitación (400-500 rpm), previo a la adición del anticuerpo. En el caso de la leptina se realizó una incubación con una solución antiséptica para permitir la unión del antígeno al anticuerpo, lavando después. El resto del protocolo fue similar para la cuantificación de los niveles de leptina, insulina y adiponectina en suero.

Se añadió a cada pocillo el anticuerpo biotinilado correspondiente (anti-leptina, anti-insulina y anti-adiponectina de rata), incubándose durante 60 minutos a temperatura ambiente. Tras los lavados de placa correspondientes mediante el lavador de placas HydroFlex (Tecan), se incubó con la estreptavidina conjugada con HRP durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavó nuevamente. Finalmente, se añadió el sustrato de la peroxidasa, deteniéndose la reacción con ácido cuando la absorbancia de las muestras alcanzó de 1,2 a 1,8 unidades de densidad óptica al medirla a 370 nm. La lectura de los resultados se realizó con el espectrofotómetro Tecan Infinite M200 a 450 nm y 590 nm y la concentración de las hormonas fue determinada a través de una curva estándar. Para el ensayo de leptina la sensibilidad del método es de 0,04 ng/ml, con una variación intra-ensayo del 2,2% y una variación inter-ensayo del 3,4%. Para el ensayo de insulina la sensibilidad del método es de 0,2 ng/ml, con una variación intra-ensayo del 1,9% y una variación inter-ensayo del 7,6%. Para el ensayo de adiponectina la sensibilidad del método es de 0,16 ng/ml y la variación intra-ensayo es 1,3%.

2.10.3. Análisis colorimétrico para la detección de los niveles séricos de colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos, proteínas totales y ácidos grasos libres

Los niveles séricos de colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), triglicéridos y proteínas totales fueron medidos utilizando kits comerciales procedentes de SpinReact (Sant Esteve de Bas, Gerona. España), y los niveles de ácidos grasos libres mediante un kit comercial ACS-ACOD (Wako. Neuss, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. Todos los ensayos se realizaron en placas de ELISA de 96 pocillos.

- **Determinación cuantitativa de colesterol:** La determinación se realiza mediante la reacción de la muestras con un reactivo compuesto por colesterol esterase, colesterol oxidasa, peroxidasa, fenol, 4-Aminofenazona y PIPES pH 6,9. Esta reacción genera un color en la muestra, cuya intensidad es proporcional a la concentración de colesterol presente en el suero analizada. Para ello, se realizó la mezcla del suero con el reactivo y éstas se incubaron 5 minutos en agitación y a 37 °C. La lectura de los resultados se realizó con el espectrofotómetro a 505 nm y la concentración de las hormonas fue determinada a través de una curva estándar.
- **Determinación cuantitativa de colesterol HDL y LDL:** La determinación se realiza en etapas. Un primer paso en el que se eliminan las lipoproteínas no-HDL o no-LDL, respectivamente, y un segundo paso en el que se realiza la medición del HDL o LDL. El producto de estas reacciones genera un color, cuya intensidad es proporcional a la concentración de HDL o LDL presente en el suero analizado. Para ello, se realizó la mezcla del suero con un reactivo (para el ensayo de HDL: colesterol esterase, colesterol oxidasa, catalasa, ascórbico oxidasa, N,N-bis (2-hidroxi-2- aminoetanosulfónico ácido pH 6,6 y N-(2-hidroxi-3 sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina. Para el caso del LDL: colesterol esterase, colesterol oxidasa, catalasa, PIPES pH 7.0, N-Etil-N- (2-hidroxi-3-silfopropil)-3-metilanina). Tras una incubación de 5 minutos en agitación y a 37 °C se añadió un segundo reactivo (para el ensayo de HDL: N,N-bis (2-hidroxi-2- aminoetanosulfónico ácido pH 7,0, 4-Aminoantipirina, peroxidasa; para el LDL: PIPES pH 7.0 4-Aminoantipirina, peroxidasa), volviendo a incubar otros 5 minutos a 37 °C en agitación. La lectura de los resultados se realizó con el espectrofotómetro a 650 nm para el ensayo de HDL

y a 600 nm para el de LDL, determinándose la concentración de las muestras mediante una curva estándar.

- Determinación cuantitativa de triglicéridos: La determinación se realiza mediante la reacción de las muestras con un reactivo compuesto por lipoproteína lipasa, glicerol quinasa, glicerol-3-oxidasa, peroxidasa, 4-aminofenazona y ATP. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 37 °C en agitación, realizándose la lectura de los resultados en el espectrofotómetro a 505 nm, determinándose la concentración de las muestras mediante una curva estándar.
- Determinación cuantitativa de proteínas totales: La determinación se realiza mediante la reacción de las muestras con un reactivo compuesto por potasio sodio tartrato 15 mmol/l, yoduro potásico 100 mmol/l, yoduro de potasio 5 mmol/l y sulfato de cobre (II) 19 mmol/l. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, en agitación, realizándose la lectura de los resultados en el espectrofotómetro a 540 nm, determinándose la concentración de las muestras mediante una curva estándar.
- Determinación cuantitativa de ácidos grasos libres: La concentración de ácidos grasos libres no esterificados (NEFA) se determina mediante la reacción de las muestras con un reactivo A (0,3 kU/l acil-CoA-sintetasa; 3 kU/l ascorbato oxidasa; 0,6 g/l coenzima A; 5 mmol/l ATP; 1,5 mmol/l 4-aminofenazona; 50 mmol/l tampón fosfato, pH = 6,9; 3 mmol/l cloruro magnésico). Tras una incubación de 10 minutos a 37 °C se añadió el reactivo B (6,6 kU/l acilCoA oxidasa; 7,5 kU/l peroxidasa; 1,2 mmol/l MEHA (3-metil-N-etil-N-(hidroxietil)-anilina)) y se realizó una segunda incubación de 10 minutos a 37 °C, para, una vez transcurrido este tiempo, determinarse la absorbancia a 550 nm en el espectrofotómetro. La concentración de NEFA se determinó mediante una curva estándar obtenida con soluciones patrón de ácido oléico (0, 0,25, 0,5, 1 M) en suero salino.

2.11. Detección de los niveles de glutamato en medio de crecimiento de cultivos celulares

Para la determinación de los niveles de glutamato en el medio de cultivo se utilizó el kit de detección de glutamato de BioVision (Mountain View, CA, Estados Unidos), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se preparó una curva de

glutamato a partir de un estándar de glutamato 1 nM y tanto la curva como los medios de cultivo de las células se diluyeron en buffer de ensayo y en una mezcla de reacción, suministrado por el fabricante. Finalmente, se pipetearon en una placa de ELISA. Tras una incubación de 30 minutos a 37 °C en oscuridad se midió la densidad óptica a 450 nm en el espectrofotómetro.

2.12. Estadística

Las muestras procedentes de cada animal o cultivo celular se analizaron por separado, estando normalizadas con respecto a los valores control de cada ensayo de WB o *RT-PCR*. Todos los experimentos *in vitro* fueron realizados un mínimo de 3 veces.

Para el análisis estadístico se empleó el programa estadístico SPSS 13.0. Los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza de una, dos o tres vías (ANOVA), en función del número de variables a considerar, con test *post-hoc* de Scheffe's F-test. Se utilizó el análisis de t-de Student de dos colas para los estudios comparativos entre dos grupos. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con un valor de la $p < 0,05$.

Todos los datos se muestran como el valor de la media y las barras de error representan el error estándar de la media (e.e.m.).

V. RESULTADOS

1. Efecto del sexo en la respuesta metabólica adulta a la mala nutrición neonatal

1.1. Efecto del tamaño de la camada, del sexo y de una dieta rica en sacarosa en la ingesta de comida y bebida y en la ganancia de peso

Para determinar el efecto de la nutrición neonatal sobre el peso de los animales, el día de nacimiento se organizaron en camadas de igual número de machos y hembras, sin diferencias en el peso corporal entre los grupos (machos: camadas de 4 crías (4CM): $6,04 \pm 0,15$, 12 (12CM): $5,98 \pm 0,09$, 20 (20CM): $6,16 \pm 0,08$ g; hembras: 4CM: $5,91 \pm 0,15$, 12CM: $5,78 \pm 0,10$, 20CM: $5,88 \pm 0,09$ g). En el destete, existió un efecto del tamaño de la camada sobre el peso corporal ($F_{(2,86)}: 334,635$; $p < 0,0001$), sin observar diferencias entre machos y hembras (Figura 22). En este momento, las ratas procedentes de las camadas de 4 crías (4CM) pesaban significativamente más que las procedentes de camadas de 12 crías (12CM), consideradas como controles. Las ratas procedentes de camadas de 20 crías (20CM), las cuales tuvieron una menor disponibilidad de nutrientes durante la lactancia, pesaban significativamente menos en el momento del destete que las ratas control y que las ratas del grupo 4CM.

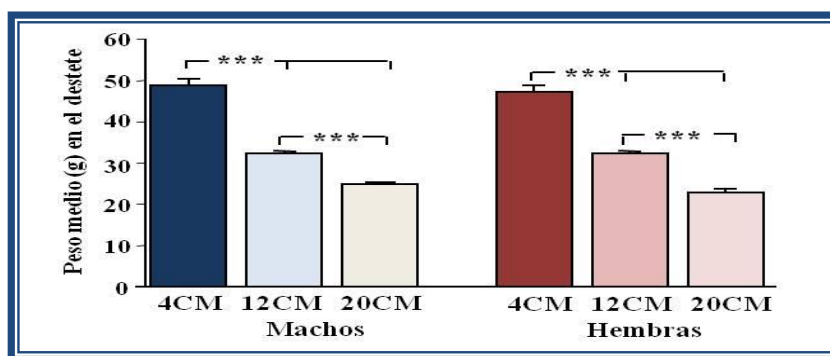


Figura 22. Peso (g) en el momento del destete de ratas macho y hembra procedentes de camadas de 4, 12 ó 20 crías por madre (CM). ANOVA: ($F_{(5,94)}: 134,522$); ***: $p \leq 0,0001$.

Durante las 5 semanas siguientes al destete, antes del cambio de dieta, existió un efecto del tamaño de la camada ($F_{(2,88)}: 5,411$; $p < 0,005$) y del sexo ($F_{(1,88)}: 42,242$; $p < 0,0001$) sobre la ingesta de comida (Figura 23). Los machos comieron significativamente más que las hembras. Además, los machos procedentes de camadas de 4 y 12 crías comieron significativamente más que las ratas procedentes de camadas de 20 crías. Aunque el grupo 4CM tuvo una mayor ingesta que el grupo 12CM, la diferencia no fue significativa. En hembras, no existió un efecto del tamaño de la

camada sobre la ingesta. El incremento de peso desde el destete hasta el momento de introducción de la dieta fue significativamente mayor en los machos que en las hembras ($F_{(1,93)}: 124,686; p < 0,0001$). Además, los machos de los grupos 4CM y 12CM ganaron significativamente más peso que los machos del grupo 20CM. No hubo diferencias en la ganancia de peso en los tres grupos de hembras (Figura 23).

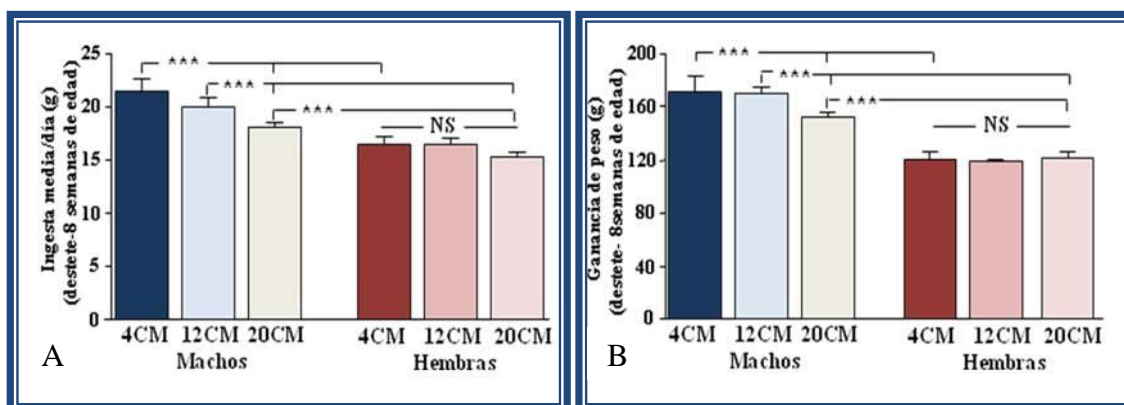


Figura 23. Ingesta media diaria (A) e incremento de peso (B) (g) desde el destete hasta las 8 semanas de edad de ratas macho y hembra procedentes de camadas de 4, 12 ó 20 crías por madre (CM). ANOVA: Ingesta $F_{(5,94)}: 10,789$; Ganancia peso $F_{(5,92)}: 20,137$; ***: $p \leq 0,0001$.

A las 8 semanas de edad, previo al cambio de dieta, existió un efecto sobre el peso corporal tanto del tamaño de camada ($F_{(2,85)}: 16,121; p < 0,0001$) como del sexo ($F_{(1,85)}: 80,643; p < 0,0001$), sin interacción entre ambos factores (Figura 24). Los machos pesaron significativamente más que las hembras procedentes de camadas del mismo tamaño. Los machos del grupo 4CM continuaron pesando más que los del los grupos 12CM y 20CM, y los 12CM más que los 20CM. En el caso de las hembras, las pertenecientes al grupo 4CM continuaron pesando significativamente más que las hembras de los grupos 12CM y 20CM.

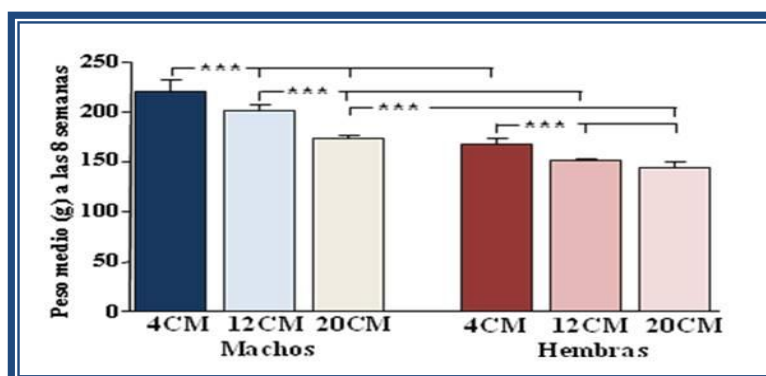


Figura 24. Peso (g) medio en el momento del cambio de dieta (8 semanas de edad) de ratas macho y hembra procedentes de camadas de 4, 12 ó 20 crías por madre (CM). ANOVA: $F_{(5,92)}: 20,137$; ***: $p \leq 0,0001$.

Hubo un efecto del tamaño de la camada ($F_{(2,88)}: 3,630, p<0,04$), del sexo ($F_{(1,88)}: 146,349; p<0,0001$) y de la ingesta de sacarosa ($F_{(1,88)}: 499,584, p<0,0001$), con una interacción entre el sexo y la ingesta de sacarosa ($F_{(1,88)}: 33,796, p<0,03$), sobre la ingesta diaria de comida sólida durante las 2 semanas que duró el cambio de dieta (Figura 25). Los machos comieron significativamente más que las hembras, independientemente del tamaño de camada mantenido durante la lactancia. Por otra parte, todas las ratas alimentadas con sacarosa redujeron significativamente la ingesta sólida con respecto a sus controles, los cuales bebían agua, tanto machos como hembras, y con independencia del tamaño de camada. Los machos de los grupos 4CM y 12CM (sin sacarosa) continuaron comiendo más que los machos del grupo 20CM.

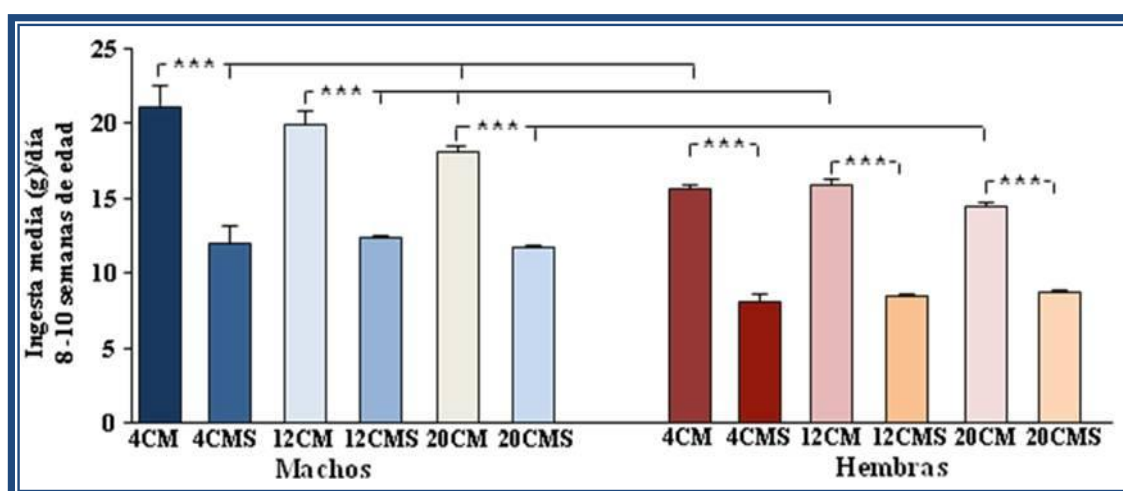


Figura 25. Ingesta media diaria (g) durante las 2 semanas de cambio de dieta de ratas macho y hembra procedentes de camadas de 4, 12 ó 20 crías por madre (CM). ANOVA: $F_{(11,88)}: 59,640$; ***: $p \leq 0,0001$.

La cantidad total de líquido ingerido durante las 2 semanas que duró el cambio de dieta estuvo significativamente afectada por el tamaño de camada ($F_{(2,88)}: 11,606, p<0,0001$) y por la disponibilidad de sacarosa ($F_{(1,88)}: 22,654, p<0,0001$). Los machos procedentes de camadas de 4 y 12 crías bebieron significativamente más agua que las procedentes de camadas de 20 crías, sin observar ningún efecto en las hembras. Ambos, machos y hembras procedentes de camadas de 4 crías alimentadas con sacarosa (4CMS), bebieron significativamente más que los de los grupos 12CMS y 20CMS. Además, las hembras del grupo 20CMS tuvieron una ingesta líquida significativamente menor que las del grupo 12CMS. Todas las ratas alimentadas con sacarosa presentan una menor ingesta líquida que aquellas que beben agua, pero sólo alcanza la significación en los grupos 12CMS de machos y 20CMS de hembras (ANOVA de 1

vía: $F_{(1,88)}: 5,347, p < 0,0001$. Machos: 4CM: $28,4 \pm 1,7$, 4CMS: $25,7 \pm 1,5$, 12CM: $28,8 \pm 1,1$, 12CMS: $22,0 \pm 0,6$, 20CM: $24,7 \pm 1,2$, 20CMS: $21,9 \pm 1,6$ ml/día; hembras: 4CM: $27,5 \pm 0,7$, 4CMS: $26,1 \pm 1,3$, 12CM: $15,2 \pm 1,5$, 12CMS: $23,8 \pm 1,2$, 20CM: $24,8 \pm 0,8$, 20CMS: $19,5 \pm 0,6$ ml/día).

La cantidad total de kilocalorías (Kcal) consumidas procedentes de la sacarosa dependía del tamaño de camada ($F_{(2,50)}: 8,494, p < 0,0006$). Los machos procedentes de camadas de 4 crías alimentadas con sacarosa consumieron significativamente más Kcal que los procedentes de los otros dos grupos de ratas macho. Las hembras procedentes de camadas de 4 y 12 crías alimentadas con sacarosa ingirieron más Kcal que las del grupo 20CMS. No se observaron diferencias entre sexos en el consumo de Kcal procedentes de la bebida (ANOVA de 1 vía: $F_{(5,52)}: 3,647, p < 0,007$. Machos: 4CMS: $509,0 \pm 30,4$, 12CMS: $436,3 \pm 10,9$, 20CMS: $361,9 \pm 55,2$ Kcal; hembras: 4CMS: $517,6 \pm 26,0$, 12CMS: $471,8 \pm 24,4$, 20CMS: $385,7 \pm 11,6$ Kcal).

Se observó un efecto del tamaño de camada ($F_{(2,88)}: 9,443; p < 0,0002$), del sexo ($F_{(1,88)}: 90,929; p < 0,0001$) y de la dieta ($F_{(1,88)}: 90,429; p < 0,0001$) sobre el total de Kcal consumidas durante las 2 semanas que abarcó el cambio de dieta (Figura 26). Los machos consumieron más calorías que las hembras procedentes de grupos del mismo tamaño de camada, consumieran o no sacarosa. Además, en ambos sexos, las ratas que recibieron sacarosa ingirieron más Kcal que las ratas control. Los machos del grupo 4CM consumieron más calorías que los del grupo 20CM, tanto si consumieron o no sacarosa. En las hembras, no hubo un efecto del tamaño de camada sobre el consumo total de calorías en ratas con una dieta normal, pero el grupo 4CMS ingirió significativamente más Kcal que el grupo 20CMS. El porcentaje de Kcal totales consumidas que fueron debidas a la sacarosa estuvo afectado tanto por el tamaño de la camada ($F_{(2,52)}: 7,178; p < 0,002$) como por el sexo ($F_{(1,52)}: 33,580; p < 0,0001$). La ingesta de sacarosa supone un mayor porcentaje del total de Kcal ingeridas en hembras, comparado con los machos del mismo tamaño de camada.

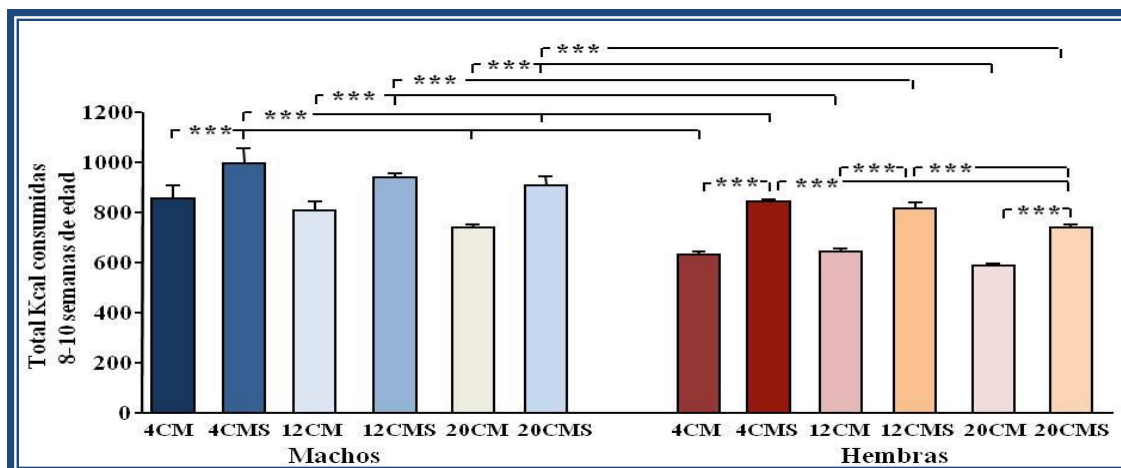


Figura 26. Total Kcal consumidas durante las 2 semanas de dieta rica en sacarosa (S) por ratas macho y hembra procedentes de camadas de 4, 12 ó 20 crías por madre (CM). ANOVA: $F_{(11,88)}: 18,525$; ***: $p \leq 0,0001$.

La ganancia de peso durante las dos semanas de cambio de dieta se vio afectada por el tamaño de camada ($F_{(2,85)}: 15,090$; $p < 0,0001$), el sexo ($F_{(1,85)}: 75,754$; $p < 0,0001$) y la ingesta de sacarosa ($F_{(1,85)}: 3,821$; $p < 0,05$), con interacción entre el tamaño de camada y el sexo ($F_{(2,85)}: 10,597$, $p < 0,0001$) así como entre el tamaño de camada y la ingesta de sacarosa ($F_{(1,85)}: 6,358$, $p < 0,003$) (Figura 27).

Los machos del grupo 4CM ganaron significativamente más peso que los de los grupos 12CM y 20CM. Del mismo modo, los machos del grupo 4CMS tuvieron una ganancia de peso significativamente mayor que la de los grupos 12CMS y 20CMS. La ganancia de peso en los machos 12CM y 20CM no fue significativamente diferente durante este periodo y la ingesta de sacarosa no tuvo efecto sobre este parámetro. Las hembras de los grupos de 4 y 20 crías ganaron más peso que las hembras del grupo 12CM, observándose el catch-up que realizan las hembras malnutridas durante la lactancia y que no se observa en los machos. La ingesta de sacarosa supuso una menor ganancia de peso en las hembras de los grupos de 4CMS y 20CMS con respecto a las ratas de su mismo grupo alimentadas con una dieta normal. La sacarosa no afectó al grupo de 12 crías en la ganancia de peso con respecto a sus controles.

Los machos ganaron más peso que las hembras procedentes de camadas del mismo número de crías a excepción del grupo 20CM, donde no existió diferencia en la ganancia de peso entre sexos.

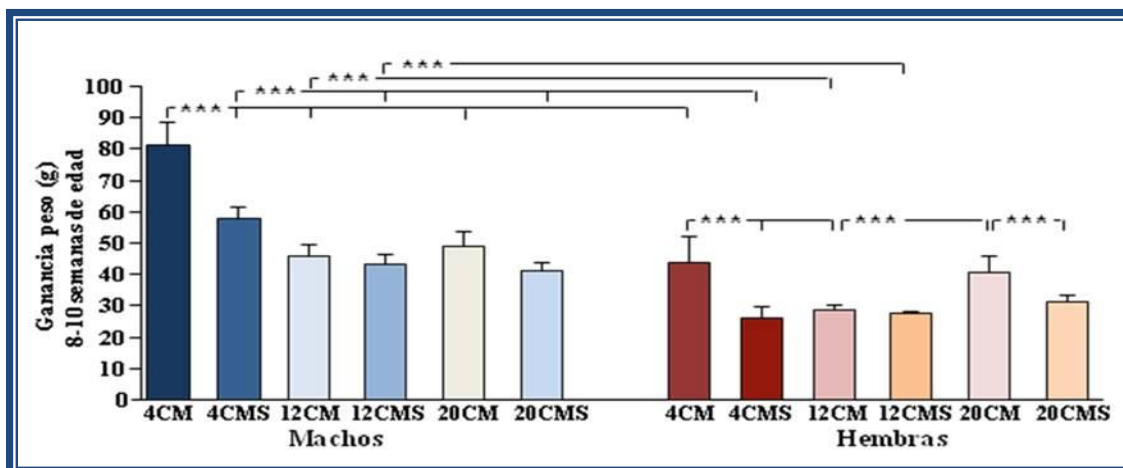


Figura 27. Incremento de peso (g) durante las 2 semanas de dieta rica en sacarosa (S) por ratas macho y hembra procedentes de camadas de 4, 12 ó 20 crías por madre (CM). ANOVA: $F_{(11,85)}$: 13,142; ***: $p \leq 0,0001$.

En el momento de sacrificio había un efecto del tamaño de la camada ($F_{(2,87)}$: 21,383; $p < 0,0002$), del sexo ($F_{(1,87)}$: 278,133; $p < 0,0001$) y de la ingesta de sacarosa ($F_{(1,87)}$: 12,096; $p < 0,002$) en el peso corporal, con interacción entre el tamaño de camada y el sexo ($F_{(2,87)}$: 8,322; $p < 0,0005$) (Figura 28). Los machos pesaron significativamente más que las hembras, con independencia del tamaño de camada y de la toma o no de sacarosa. Además, los machos procedentes de camadas de 4 crías pesaron significativamente más que los machos de los grupos de 12 crías, con independencia de la dieta. Solo los machos del grupo 12CMS tuvieron un descenso significativo del peso corporal comparado con sus controles (12CM). Las hembras del grupo 4CM presentaron mayor peso que los controles en el momento del sacrificio. Además, la ingesta de sacarosa en las hembras procedentes de camadas de 20 crías disminuyó el peso final de las ratas.

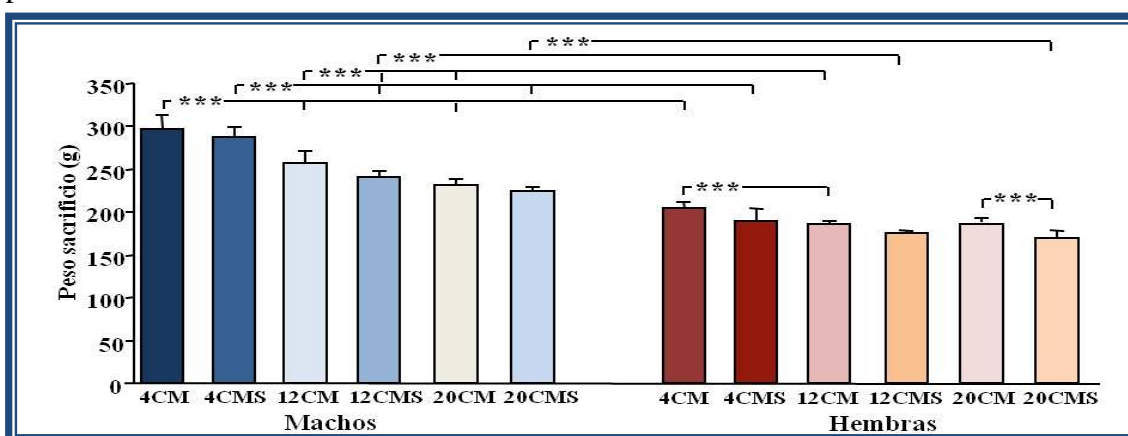


Figura 28. Peso en el momento de sacrificio (g) de ratas macho y hembra procedentes de camadas de 4, 12 ó 20 crías por madre (CM). ANOVA: $F_{(11,87)}$: 30,642; ***: $p \leq 0,0001$. S: dos semanas de dieta rica en sacarosa.

1.2. Efecto del tamaño de la camada, del sexo y de una dieta rica en sacarosa sobre los niveles séricos de hormonas metabólicas

La ingesta excesiva de sacarosa tuvo efecto sobre la glucemia ($F_{(1,87)}$: 6,210, $p < 0,02$), pero no existió una diferencia significativa en ningún grupo experimental (Tabla 7). Los niveles séricos de insulina se vieron significativamente afectados por el sexo ($F_{(1,62)}$: 11,203; $p < 0,02$), no así por el tamaño de camada o por el tipo de dieta (Tabla 7). Los machos tuvieron unos niveles de insulina significativamente superiores a los de las hembras, con independencia del tamaño de la camada o del tipo de dieta de las ratas. Se encontró un efecto del tamaño de la camada ($F_{(2,62)}$: 3,393; $p < 0,05$), del sexo ($F_{(1,62)}$: 19,832; $p < 0,0001$) y de la ingesta de sacarosa ($F_{(1,62)}$: 13,076; $p < 0,0006$) sobre los niveles séricos de leptina (Tabla 7). Todas las ratas que bebían sacarosa tendían a tener incrementados los niveles séricos de leptina con respecto a las ratas procedentes de camadas del mismo tamaño que seguían una dieta normal, con diferencias significativas en los grupos de machos de 4 y 20 crías. No se detectó ningún efecto del tamaño de camada, del sexo o de la dieta en los niveles séricos de ghrelina total o acilada (Tabla 7).

	MACHOS						HEMBRAS						p
	4 CM		12 CM		20 CM		4 CM		12 CM		20 CM		
	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S	
Glucemia (mg/dl)	90,0 ± 4,2	102,1 ± 2,8	89,0 ± 5,9	91,9 ± 4,6	83,4 ± 4,1	102,0 ± 3,1	91,0 ± 4,6	92,8 ± 1,8	89,1 ± 2,6	94,5 ± 2,6	87,1 ± 2,9	86,3 ± 3,8	p<0.02
Insulina (ng/ml)	1,5 ± 0,6	1,6 ± 0,6	1,2 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,8 ± 0,6	0,4 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,3 ^a	p<0.05
Leptina (ng/ml)	4,8 ± 0,5	10,3 ± 2,4	4,4 ± 1,6	5,5 ± 0,7	3,5 ± 0,6	6,2 ± 0,5	2,8 ± 0,7	4,1 ± 1,0	3,1 ± 0,4	3,9 ± 0,5	2,2 ± 0,4	3,1 ± 0,4	p<0.0001
Ghrelina total (pg/ml)	1324, 1 ±	1549, 5 ±	1523, 8 ±	1846, 9 ±	1589, 9 ±	2478,7 ±	1223, 9 ±	1638, 4 ±	2223, 2 ±	1798, 5 ±	1662, 8 ±	1838,5 ±	NS
Ghrelina acilada (pg/ml)	549,5 ±	515,0 ±	471,2 ±	676,4 ±	554,9 ±	530,2 ±	965,6 ±	432,7 ±	492,6 ±	320,9 ±	412,3 ±	399,0 ±	NS
	65,5	98,2	53,5	158,8	166,0	72,3	403,9	87,5	79,0	50,4	65,9	33,0	

Tabla 7. Niveles de glucosa en sangre y niveles de hormonas en suero en ratas macho y hembra procedentes de camadas de 4, 12 ó 20 crías por madre (CM) y alimentadas durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33%. A: agua; S: sacarosa 33%. Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (e.e.m.). a: estadísticamente diferente comparado con las ratas control del sexo opuesto, desde el mismo grupo experimental (tamaño camada y dieta). NS: no significativo. Glucemia: realizado a todos los animales del estudio. Hormonas: n=6.

2. Efecto de la sobrenutrición neonatal en la respuesta metabólica a una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta o desde el destete

Con el fin de comprender mejor los cambios metabólicos que suceden en respuesta a una sobrenutrición neonatal y de cómo éstos afectan a la respuesta a una dieta rica en sacarosa, se realizaron varios experimentos en los cuales se emplearon ratas macho, ya que el efecto observado en el experimento anterior era mayor en los machos y porque además, en el caso de las hembras, existía una gran variabilidad en los niveles de hormonas metabólicas, lo que podía ser debido a los cambios estrales de las mismas. Por otra parte, con el objetivo de estudiar las posibles diferencias de efecto de una dieta rica en sacarosa de corta o larga duración, a un primer grupo de ratas macho se le suministró la dieta en la etapa adulta (día postnatal 60), durante los 15 días previos al sacrificio, y a un segundo grupo se le suministró esta dieta en el momento del destete, manteniéndose durante 2 meses, hasta el momento del sacrificio. En contraste con el primer experimento descrito, las ratas fueron sacrificadas tras 12 horas de ayuno, tal y como se realiza en la mayoría de estudios metabólicos, con el fin de disminuir la variabilidad en los niveles séricos de las hormonas analizadas.

2.1. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre la ingesta de comida y bebida

La ingesta media diaria de comida desde el destete hasta el cambio de dieta fue mayor ($p < 0,001$) en el grupo 4CM ($24,3 \pm 1,0$ g) con respecto al grupo control (12CM) ($21,3 \pm 0,3$ g). Durante las dos semanas en las que las ratas fueron alimentadas con la dieta rica en sacarosa, la ingesta media diaria de pienso estuvo afectada por el tamaño de la camada ($F_{(1,38)}: 4,481; p < 0,05$) y por la ingesta de sacarosa ($F_{(1,38)}: 54,852; p < 0,0001$), sin observarse una interacción entre ambos factores (Tabla 8). En contraste con el experimento anterior, las ratas procedentes de camadas de 4 crías tuvieron una menor ingesta que las ratas control durante estas dos semanas del estudio. Las alimentadas con sacarosa ingirieron menos comida que las alimentadas con dieta normal (Tabla 8).

En la cantidad diaria de líquido ingerido no hubo un efecto de la sobrenutrición neonatal ni de la dieta *per se*. Sin embargo, sí existió una interacción entre el tamaño de la camada y la ingesta de sacarosa sobre esta variable ($F_{(1,38)}$: 24,729; $p < 0,0001$). Las ratas procedentes de camadas de 4 crías ingirieron una menor cantidad de agua que los controles y las ratas del grupo 4CMS bebieron significativamente más que sus controles (4CM) y que las ratas del grupo 12CMS (Tabla 8).

Se observó un efecto del tamaño de camada ($F_{(1,38)}$: 4,481; $p < 0,05$) y de la dieta ($F_{(1,38)}$: 54,86; $p < 0,0001$) sobre las Kcal consumidas procedentes del pienso durante las 2 semanas que abarcó el cambio de dieta, sin existir interacción entre ambos factores. Los grupos que recibieron sacarosa consumieron menos Kcal a través de la comida sólida que aquellas de su mismo tamaño de camada que recibieron agua (Tabla 8). Del mismo modo, el grupo 4CM consumió menos calorías que el grupo control, 12CM.

En relación a la cantidad de Kcal totales ingeridas durante las dos semanas de cambio de dieta (teniendo en cuenta las Kcal procedentes tanto del pienso como de la bebida), se observó un efecto de la dieta ($F_{(1,38)}$: 13,989; $p < 0,002$), así como una interacción entre el tamaño de camada y la ingesta de sacarosa ($F_{(1,38)}$: 6,381; $p < 0,02$). Las ratas que recibieron sacarosa ingirieron más Kcal que las ratas control, con independencia del tamaño de camada y las del grupo 4CM consumieron menos Kcal que las que consumió el grupo de 12CM (Tabla 8).

	12 crías/madre		4 crías/madre		p
	Agua	Sacarosa 33%	Agua	Sacarosa 33%	ANOVA 1-vía
Ingesta diaria media de comida solida (g)	23,2 ± 1,5	13,3 ± 0,4*	18,8 ± 0,7*	13,2 ± 0,2*#	p < 0,0001
Líquido diario medio ingerido(ml)	26,9 ± 0,5	24,6 ± 0,6	23,8 ± 0,3*	27,5 ± 0,7#	p < 0,0001
Kcal procedentes del pienso	67,2 ± 4,5	38,5 ± 1,1*	54,7 ± 2,1*	38,2 ± 0,7*#	p < 0,0001
Kcal procedentes del pienso+líquido	67,2 ± 4,5	71,1 ± 1,9*	54,7 ± 2,1*	74,5 ± 0,2*#	p < 0,0001

Tabla 8. Ingesta media (g) diaria de comida solida, cantidad media diaria de líquido ingerido (ml) y kilocalorías (Kcal) consumidas durante el cambio de la dieta en ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre y alimentadas durante dos semanas con pienso de rata *ad libitum* y agua ó una solución de sacarosa al 33%. Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (e.e.m.). *: significativamente diferente respecto al grupo control (12CM); #: significativamente diferente respecto al grupo 4CM.

2.2. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre el peso corporal y los depósitos de tejido adiposo y el músculo

La ganancia de peso durante las dos semanas de cambio de dieta se afectó por el tamaño de la camada ($F_{(1,38)}$: 10,759; $p < 0,003$) y por la ingesta de sacarosa ($F_{(1,38)}$: 7,198; $p < 0,02$) (Figura 29A). Las ratas sobrenutridas durante la lactancia presentaron un mayor incremento de peso que las procedentes de camadas de 12 crías que llevaban el mismo tipo de dieta. Además, aquellas que ingerían sacarosa presentaban un menor incremento de peso que los grupos control, con independencia del tamaño de la camada, a pesar de ingerir una mayor cantidad de Kcal (Figura 29B).

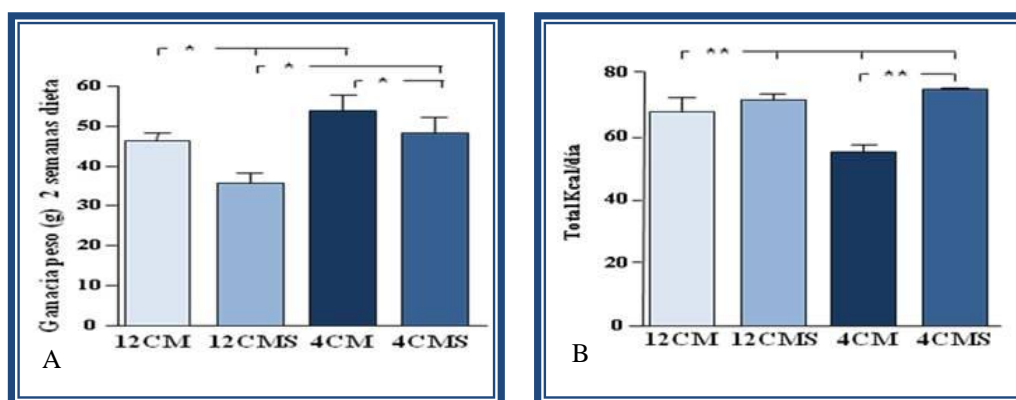


Figura 29. Ganancia de peso (g) (A) y Kcal consumidas (B) durante las 2 semanas de cambio de dieta en ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre (CM) y alimentadas durante las dos semanas anteriores al sacrificio (PND 75) con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33% (S). ANOVA: Ganancia peso: $F_{(3,33)}$: 6,283; $p < 0,01$; Kcal totales: $F_{(3,38)}$: 6,524; $p < 0,001$.

En el momento de sacrificio había un efecto del tamaño de la camada ($F_{(1,23)}$: 18,387; $p < 0,0001$) y de la ingesta de sacarosa ($F_{(1,23)}$: 15,601; $p < 0,001$) en el peso corporal, siendo éste mayor en el grupo 4CM respecto al grupo 12CM y estando disminuido en los grupos alimentados con sacarosa respecto a los grupos de su mismo tamaño de camada alimentados con dieta normal (Figura 30).

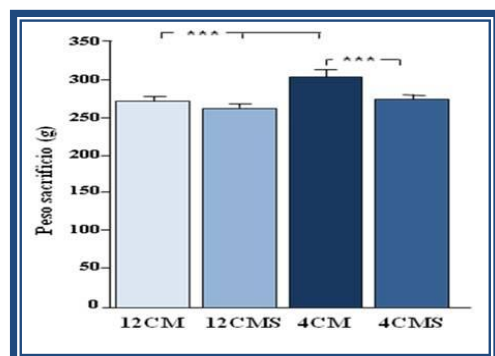


Figura 30. Peso (g) en el momento de sacrificio (PND 75) en ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre (CM) y alimentadas durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33% (S). ANOVA: $F_{(3,23)}$: 12,372; $p < 0,0001$.

No se observó un efecto significativo del tamaño de la camada en el peso de la grasa subcutánea (GSC) ni en el de la grasa visceral (GV), al indicar el peso de la grasa por 100 gramos de peso corporal. La ingesta de sacarosa incrementó los depósitos de GSC en ambos grupos 4CMS y 12CMS, y los de GV sólo en el grupo de 4CMS (GSC/100 g peso corporal: $F_{(1,24)}$: 35,042; $p < 0,0001$; GV/100 g peso corporal: $F_{(1,24)}$: 6,897; $p < 0,02$) (Figura 31A y 31B). Sin embargo, sí hubo un efecto del tamaño de la camada ($F_{(1,24)}$: 18,341; $p < 0,0003$) y de la ingesta de sacarosa ($F_{(1,24)}$: 14,085; $p < 0,001$) sobre el peso absoluto de los depósitos de grasa visceral (12CM: $2,7 \pm 0,2$, 12CMS: $3,3 \pm 0,2$, 4CM: $3,4 \pm 0,1$, 4CMS: $4,3 \pm 0,2$ g; ANOVA de 1 vía: $p < 0,0001$).

El peso del músculo sóleo era mayor en las ratas procedentes de camadas de 4 crías ($F_{(1,24)}$: 6,790; $p < 0,02$) y, al contrario de lo que ocurría con la grasa, las ratas que ingerían sacarosa el músculo sóleo pesaba menos que las que bebían agua ($F_{(1,24)}$: 6,556; $p < 0,02$) (Figura 31C).

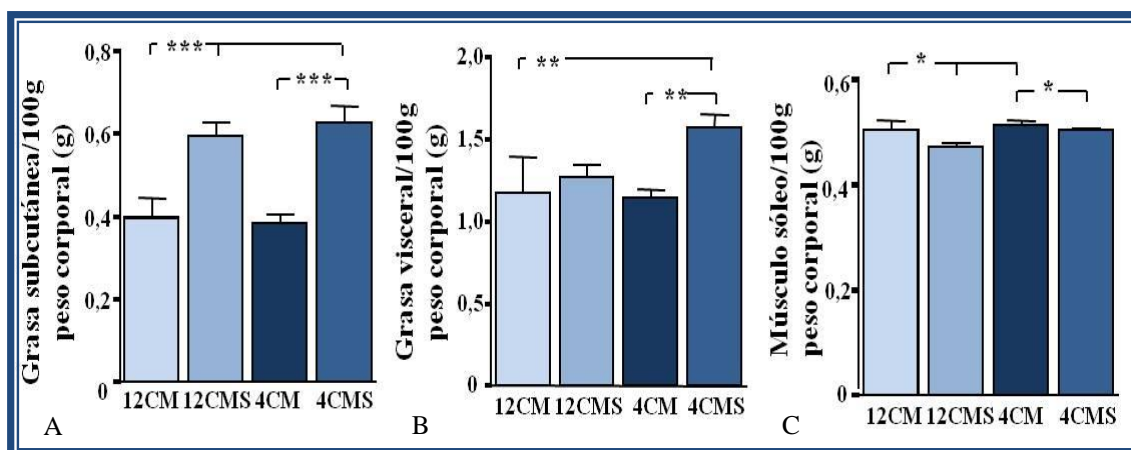


Figura 31. Peso de la grasa subcutánea (A), visceral (B) y músculo sóleo (C) (g) por 100 gramos de peso corporal en ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre (CM) y alimentadas durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33% (S) ANOVA: GSC: $F_{(3,24)}$:12,448; $p < 0,0001$; GV: $F_{(3,24)}$:4,537; $p < 0,01$; M: $F_{(3,24)}$:5,865; $p < 0,005$).

2.3. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los niveles séricos de hormonas metabólicas

En el momento del sacrificio, tanto el tamaño de camada ($F_{(1,28)}$: 7,459; $p < 0,01$) como el tipo de dieta ($F_{(1,28)}$: 13,177; $p < 0,001$) afectaron los niveles séricos de leptina, sin encontrar interacción entre ambos factores. La mayor disponibilidad de nutrientes durante la lactancia y la ingesta de sacarosa incrementaron los niveles de leptina en

suero (Tabla 9). No existieron diferencias significativas en los niveles de insulina entre los grupos de estudio (Tabla 9).

Los niveles circulantes de ghrelina total estaban afectados por el tamaño de la camada ($F_{(1,23)}$: 28,138; $p < 0,001$), presentándose valores disminuidos en ambos grupos de 4 crías. Los niveles séricos de ghrelina acilada no se vieron afectados significativamente ni por el tamaño de camada ni por la dieta. El porcentaje de acilación de esta hormona también se vio afectado por el tamaño de la camada ($F_{(1,23)}$: 10,201; $p < 0,005$), siendo mayor en los grupos de 4 crías (Tabla 9).

La ingesta de sacarosa incrementó los niveles de adiponectina ($F_{(1,29)}$: 27,228; $p < 0,0001$) y disminuyó los de corticosterona ($F_{(1,19)}$: 9.095, $p < 0,008$) (Tabla 9).

	12 crías/madre		4 crías/madre		p
	Agua	Sacarosa 33%	Agua	Sacarosa 33%	
Insulina (ng/ml)	0,38 ± 0,13	0,53 ± 0,1	0,55 ± 0,07	0,27 ± 0,09	NS
Leptina (ng/ml)	0,89 ± 0,16	1,74 ± 0,31	1,49 ± 0,22	2,56 ± 0,29* [#]	p < 0,001
Ghrelina total (pg/ml)	1563,9 ± 201,9	1655,2 ± 165,3	834,6 ± 66,4*	817,1 ± 95,3* [∞]	p < 0,0001
Ghrelina acilada (pg/ml)	175,6 ± 19,6	211,2 ± 27,1	152,3 ± 9,1	175,0 ± 10,0	NS
Porcentaje acilación	12,5 ± 2,2	14,2 ± 2,7	18,8 ± 1,8	22,8 ± 2,4* [∞]	p < 0,01
Adiponectina (ng/ml)	37,0 ± 3,1	59,1 ± 3,8*	39,1 ± 3,2	54,2 ± 3,8* [#]	p < ,0001
Corticosterona (ng/ml)	122,5 ± 15,7	47,6 ± 16,0*	116,2 ± 17,4	84,5 ± 21,0* [#]	p < 0,01

Tabla 9. Niveles de hormonas en suero en ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre y alimentadas durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y con agua o una solución de sacarosa al 33%. Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (e.e.m.). *: significativamente diferente respecto al grupo control (12CM). #: significativamente diferente respecto al grupo 4CM. ∞: significativamente diferente respecto al grupo 12CMS. NS: no significativo. n=7.

2.4. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los niveles séricos de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres y proteínas totales

Mientras que los niveles de triglicéridos no se vieron afectados ni por la dieta ni por el tamaño de camada, los niveles de colesterol ($F_{(1,23)}$: 13,651; $p < 0,001$), de LDL-colesterol ($F_{(1,23)}$: 16,950; $p < 0,001$) y de ácidos grasos libres ($F_{(1,23)}$: 6,141; $p < 0,03$) se

vieron modificados por la ingesta de sacarosa. Los grupos de ratas alimentados con sacarosa presentaron unos niveles de colesterol y de LDL-colesterol significativamente disminuidos a la vez que unos niveles de ácidos grasos libres incrementados con respecto a sus grupos control. Los niveles de HDL-colesterol y de proteínas totales no se vieron afectados por estos factores (Tabla 10).

	12 crías/madre		4 crías/madre		p
	Agua	Sacarosa 33%	Agua	Sacarosa 33%	
Triglicéridos (ng/ml)	109,6 ± 12,7	96,5 ± 11,1	67,0 ± 6,0	92,0 ± 17,9	NS
Colesterol (ng/ml)	64,9 ± 5,4	52,8 ± 1,9	59,9 ± 3,2	46,4 ± 2,3*	p < 0,01
LDL-colesterol (ng/ml)	32,1 ± 2,3	25,0 ± 1,5	31,1 ± 1,6	23,0 ± 1,9* [#]	p < 0,005
HDL-colesterol (mM)	20,5 ± 2,9	22,8 ± 3,1	14,9 ± 1,5	22,3 ± 3,7	NS
Ácidos grasos libres (ng/ml)	1,38 ± 0,15	1,61 ± 0,10	1,49 ± 0,18	2,15 ± 0,27* [#]	p < 0,03
Proteínas totales (ng/ml)	6,1 ± 0,3	5,8 ± 0,2	5,9 ± 0,1	6,1 ± 0,4	NS

Tabla 10. Niveles de triglicéridos, colesterol total, LDL, HDL y proteínas totales en suero en ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre y alimentadas durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33%. Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (e.e.m.). *: significativamente diferente respecto al grupo control (12CM); #: significativamente diferente respecto al grupo 4CM; °: significativamente diferente respecto al grupo 12CMS. NS: no significativo. n=6.

2.5. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre la morfología de los adipocitos viscerales

Tanto la sobrenutrición neonatal como la ingesta de sacarosa generaron una hipertrofia de los adipocitos viscerales. Se observó un incremento en el perímetro de los adipocitos en los grupos de 4 crías con respecto a los de 12 crías (tamaño camada: $F_{(1,15)}$: 144,979; $p < 0,0001$), así como en los grupos alimentados con sacarosa con respecto a sus controles (sacarosa: $F_{(1,15)}$: 44,848; $p < 0,0001$), existiendo interacción entre ambos factores ($F_{(1,15)}$: 21,685; $p < 0,001$) (Figura 32).

Además, existió una correlación positiva entre el tamaño de los adipocitos viscerales y los niveles séricos de leptina ($R = 0,70$; $p < 0,005$).

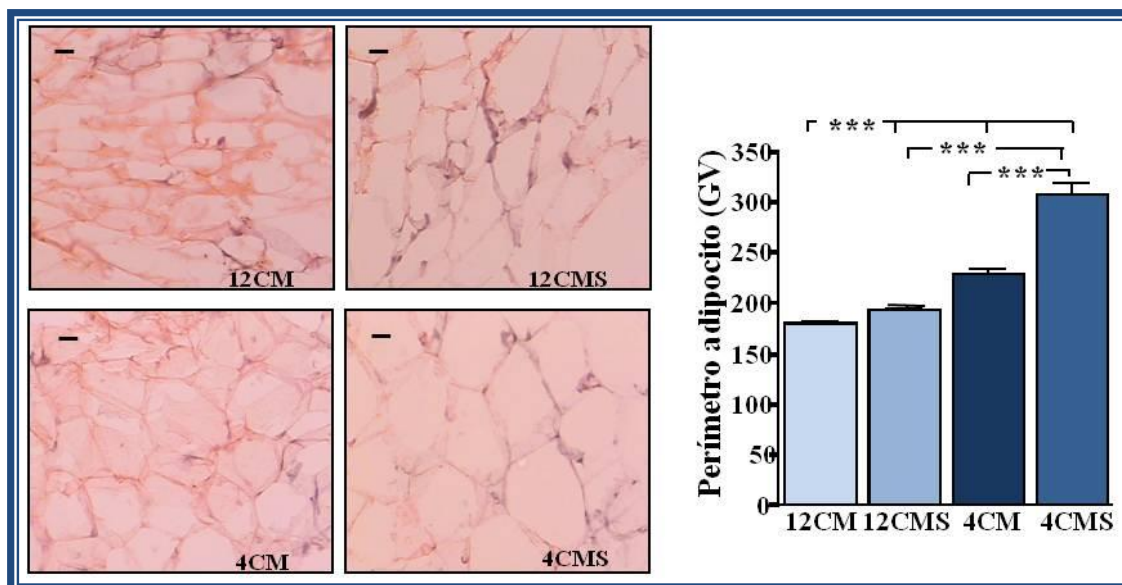


Figura 32. Perímetro (μm) de los adipocitos de la grasa visceral (GV) en ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre (CM) y alimentadas durante dos semanas con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33% (S). ANOVA: $F_{(3,15)}:70,504$; $p<0,0001$. Imágenes del tejido visceral 40X. Escala 10 micras (μm). $n=4$.

2.6. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los neuropéptidos hipotalámicos implicados en la ingesta y el receptor de leptina

Los niveles hipotalámicos de ARNm de los neuropéptidos NPY, AgRP, POMC y CART no se vieron modificados ni por el tamaño de camada ni por efecto de la dieta (Tabla 11). Sin embargo, los niveles de orexina estaban afectados por la sacarosa ($F_{(1,17)}: 6,886$; $p<0,05$) y por la interacción entre los factores de estudio ($F_{(1,17)}: 5,070$; $p<0,05$) (Tabla 11), estando significativamente elevados en las ratas del grupo 4CMS.

Los niveles de expresión del receptor de leptina (ObR) se encontraron afectados por el tamaño de camada ($F_{(1,17)}: 10,156$; $p<0,008$) y por la ingesta de sacarosa ($F_{(1,17)}: 11,246$; $p<0,006$), sin existir interacción entre ambos factores. Se observó un incremento de los niveles hipotalámicos del receptor de leptina en las ratas procedentes de camadas de 4 crías, así como en las alimentadas con sacarosa con respecto a sus controles (Tabla 11).

	12 crías/madre		4 crías/madre		p
	Agua	Sacarosa 33%	Agua	Sacarosa 33%	ANOVA 1-vía
NPY	100 ± 8,8	99,5 ± 12,9	91,8 ± 6,0	140,7 ± 6,8	NS
AgRP	100 ± 7,6	110,4 ± 11,3	84,0 ± 2,6	132,9 ± 15,8	NS
POMC	100 ± 8,1	90,0 ± 7,6	125,4 ± 17,6	134,4 ± 26,5	NS
CART	100 ± 7,4	109,1 ± 13,7	108,3 ± 10,6	135,6 ± 6,4	NS
Orexina	100 ± 12,7	117,5 ± 16,3	73,6 ± 1,0	171,3 ± 33,5* ^{#∞}	p < 0,04
ObR	100 ± 9,5	124,9 ± 10,1*	123,1 ± 13,8*	170,7 ± 9,1* ^{#∞}	p < 0,002

Tabla 11. Niveles relativos de mensajero de los neuropéptidos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta y del receptor de leptina en el hipotálamo de ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre y alimentadas durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33%. Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (e.e.m.). *: significativamente diferente respecto al grupo control (12CM); #: significativamente diferente respecto al grupo 4CM; ∞: significativamente diferente respecto al grupo 12CMS. NS: no significativo. n=5.

2.7. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 meses, desde el destete hasta el sacrificio, sobre la ingesta de comida y bebida

La ingesta media diaria de pienso desde el destete, momento en el que se realiza el cambio de dieta, hasta el sacrificio estuvo afectada por el tamaño de la camada ($F_{(1,73)}$: 77,767; $p < 0,0001$) y por la ingesta de sacarosa ($F_{(1,73)}$: 506,906; $p < 0,0001$), sin observarse una interacción entre ambos factores. Las ratas procedentes de camadas de 4 crías consumían más comida que las procedentes de camadas de 12 crías, independientemente de si tomaban o no sacarosa. Además, las ratas expuestas a una dieta rica en sacarosa consumían menos comida sólida que sus controles (Tabla 12).

Sobre la cantidad diaria de líquido ingerido, medido desde el destete hasta el sacrificio, hubo un efecto de la dieta ($F_{(1,73)}$: 56,674; $p < 0,0001$), de forma que los grupos alimentados con sacarosa ingirieron menos líquido que los grupos control (Tabla 12).

Se observó un efecto del tamaño de camada ($F_{(1,73)}$: 77,767; $p < 0,0001$) y de la dieta ($F_{(1,73)}$: 506,906; $p < 0,0001$) sobre las Kcal medias consumidas al día procedentes del pienso desde el destete hasta el sacrificio, sin existir interacción entre ambos factores. Los grupos de ratas que recibieron sacarosa consumieron menos Kcal a través del pienso que aquellas de su mismo tamaño de camada que recibieron agua. En relación a la cantidad de Kcal medias totales consumidas al día (Kcal procedentes tanto de la comida sólida como de la bebida), se observó un efecto del tamaño de camada ($F_{(1,73)}$: 41,847; $p < 0,0001$) y de la dieta ($F_{(1,73)}$: 164,144; $p < 0,0001$), sin existir interacción entre

ambos factores sobre esta variable. Las ratas de camadas de 4 crías consumieron más Kcal que sus controles, del mismo modo que ambos grupos de ratas que recibieron sacarosa ingirieron más Kcal que las que bebían agua (Tabla 12).

	12 crías/madre		4 crías/madre		p
	Agua	Sacarosa 33%	Agua	Sacarosa 33%	
Ingesta diaria media de comida sólida(g)	18,1 ± 0,2	12,1 ± 0,2*	19,9 ± 0,3*	14,7 ± 0,1* ^{#∞}	p< 0,0001
Líquido diario medio ingerido(ml)	28,2 ± 0,5	22,5 ± 0,7*	29,0 ± 1,0	23,3 ± 0,6* [#]	p< 0,0001
Kcal procedentes del pienso	52,6 ± 0,7	35,0 ± 0,5*	57,9 ± 0,9*	42,6 ± 0,3* ^{#∞}	p< 0,0001
Kcal procedentes del pienso+líquido	52,6 ± 0,7	64,7 ± 1,2*	57,9 ± 0,9*	73,3 ± 0,9* ^{#∞}	p< 0,0001

Tabla 12. Ingesta media diaria de pienso (g), cantidad media diaria de líquido ingerido (ml) y kilocalorías (Kcal) consumidas desde el destete hasta el sacrificio en ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre (CM) y alimentadas desde el destete hasta el sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33%. Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (e.e.m.). *: significativamente diferente respecto al grupo control (12CM); #: significativamente diferente respecto al grupo 4CM; ∞: significativamente diferente respecto al grupo 12CMS.

2.8. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 meses, desde el destete hasta el sacrificio, sobre el peso corporal y los depósitos de tejido adiposo y el músculo

En el momento del sacrificio el peso corporal estaba afectado por el tamaño de camada ($F_{(1,73)}$: 17,063; $p<0,0001$) y por la ingesta de sacarosa ($F_{(1,73)}$: 38,898; $p<0,001$), de manera que las ratas de los grupos de 4 crías presentaban un mayor peso corporal que las de 12 crías alimentadas con el mismo tipo de dieta. Además, el peso corporal de los grupos alimentados con sacarosa era menor que el de los grupos que seguían una dieta normal (Figura 33).

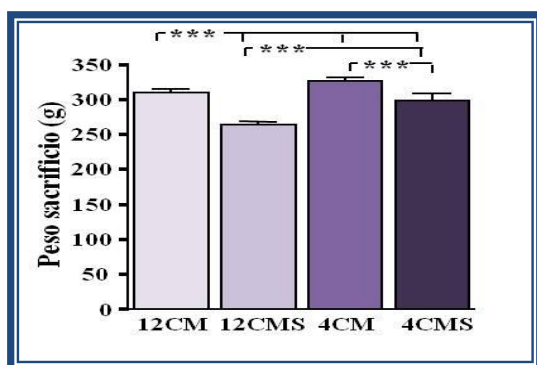


Figura 33. Peso en el momento de sacrificio en ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre (CM) y alimentadas desde el destete hasta el sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33% (S). ANOVA: $F_{(3,73)}$: 22,821; $p<0,0001$.

No se observó un efecto significativo del tamaño de la camada en la cantidad de grasa subcutánea/100g peso corporal, pero sí de la ingesta de sacarosa, que incrementó la cantidad grasa subcutánea ($F_{(1,51)}: 24,305; p<0,0001$). Además, existió una interacción entre el tamaño de camada y la ingesta de sacarosa sobre la cantidad de grasa subcutánea ($F_{(1,51)}: 5,365; p<0,03$) (Figura 34A). Tanto los depósitos de grasa visceral como el peso de músculo sóleo/100 g peso corporal estaban afectados por el tamaño de la camada (GV: $F_{(1,51)}: 9,280; p<0,005$; músculo: $F_{(1,51)}: 9,547; p<0,004$) y por la dieta (GV: $F_{(1,51)}: 70,09; p<0,0001$; músculo: $F_{(1,51)}: 42,417; p<0,0001$) (Figura 34B y 34C). La ingesta de sacarosa incrementó los niveles de grasa visceral en ambos grupos alimentados con sacarosa respecto a sus controles, siendo mayores en el grupo de 4CMS que en el de 12CMS. El peso del músculo sóleo estaba disminuido en los grupos que consumían sacarosa e incrementado en el grupo de 4CM respecto al 12CM.

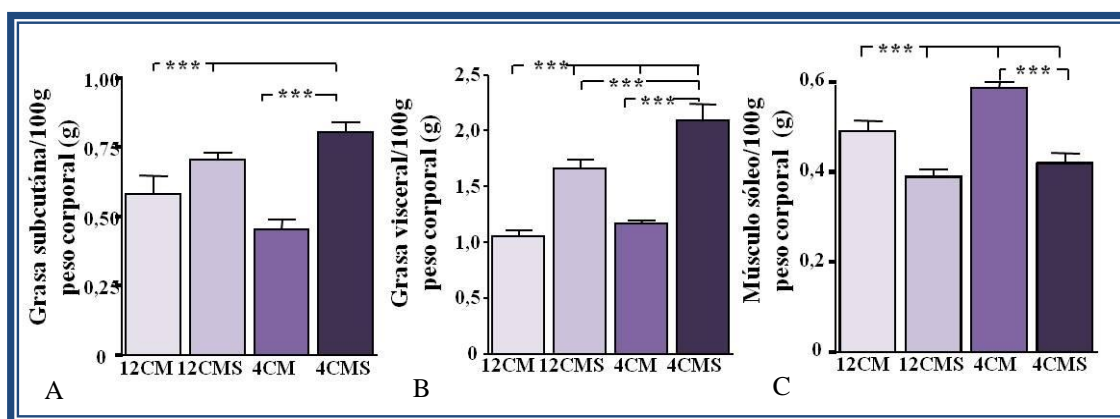


Figura 34. Peso de la grasa subcutánea (A), visceral (B) y del músculo sóleo (C) (g) por 100 gramos de peso corporal en ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre (CM) y alimentadas desde el destete hasta el sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33% (S). ANOVA: GS: $F_{(3,51)}: 21,940; p<0,0001$; GV: $F_{(3,51)}: 18,246; p<0,0001$; M: $F_{(3,51)}: 11,693; p<0,0001$. *** = $p<0,0001$.

2.9. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 meses, desde el destete hasta el sacrificio, sobre los niveles séricos de hormonas metabólicas

En el momento del sacrificio, los niveles de leptina y de insulina se vieron afectados tanto por el tamaño de camada (leptina: $F_{(1,28)}: 1,459; p<0,05$; insulina: $F_{(1,22)}: 6,504; p<0,03$) como por la ingesta de sacarosa (leptina: $F_{(1,28)}: 15,087; p<0,02$; insulina: $F_{(1,22)}: 24,155; p<0,0001$). En el caso de los niveles de insulina existió una interacción entre ambos factores ($F_{(1,22)}: 14,951; p<0,002$). El grupo 4CM presentó unos niveles de leptina incrementados con respecto al grupo 12CM. Los niveles séricos de

ambas hormonas estaban incrementados en los grupos que ingerían azúcar con respecto a los grupos de su mismo tamaño de camada que no recibieron esta dieta. En el caso de los niveles de insulina, éstos estaban incrementados significativamente en el grupo 4CMS con respecto al grupo 12CMS (Tabla 13).

Los niveles séricos de ghrelina total se encontraban afectados por el tamaño de la camada ($F_{(1,29)}: 8,606; p<0,008$), estando disminuidos en ratas procedentes de camadas de 4 crías, con independencia del tipo de dieta que recibieran. Los niveles de ghrelina acilada también estaban afectados por el tamaño de camada ($F_{(1,29)}: 5,635; p<0,03$) y por la dieta ($F_{(1,29)}: 8,001; p<0,01$), estando disminuídos en los grupos de 4 crías con respecto a los de 12 crías e incrementados en los grupos que ingerían sacarosa con respecto a los grupos de su mismo tamaño de camada que bebían agua. Ni la sobrenutrición ni la dieta rica en sacarosa modificaron el porcentaje de acilación de esta hormona (Tabla 13).

La ingesta de sacarosa incrementó significativamente los niveles séricos de adiponectina, con independencia del tamaño de camada ($F_{(1,25)}: 30,498; p<0,0001$) (Tabla 13). Los niveles de corticosterona no se vieron modificados ni por el tamaño de camada ni por la ingesta de sacarosa (Tabla 13).

	12 crías/madre		4 crías/madre		p
	Agua	Sacarosa 33%	Agua	Sacarosa 33%	ANOVA 1-vía
Insulina (ng/ml)	0,99 ± 0,15	1,14 ± 0,13	0,81 ± 0,04	2,02 ± 0,16 ^{*#∞}	p < 0,001
Leptina (ng/ml)	2,8 ± 0,2	5,9 ± 0,5 [*]	4,2 ± 0,6 [*]	5,3 ± 0,8 ^{*#}	p < 0,0001
Ghrelina total (pg/ml)	1801,7 ± 209,5	1840,0 ± 262,9	1045,9 ± 37,1 [*]	1402,7 ± 167,5 ^{*#∞}	p < 0,05
Ghrelina acilada (pg/ml)	227,7 ± 14,5	328,8 ± 32,5 [*]	182,9 ± 22,2 [*]	240,5 ± 34,1 ^{#∞}	p < 0,01
Porcentaje acilación	13,9 ± 1,9	19,3 ± 2,1	17,5 ± 2,0	18,2 ± 2,9	NS
Adiponectina (ng/ml)	51,9 ± 4,1	80,0 ± 5,0 [*]	37,4 ± 5,7	71,9 ± 8,1 [#]	p < 0,0001
Corticosterona (ng/ml)	114,9 ± 14,4	139,9 ± 8,4	136,9 ± 18,9	132,9 ± 15,0	NS

Tabla 13. Niveles de hormonas en suero de ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre y alimentadas desde el destete y hasta el sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33%. Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (e.e.m.). *: significativamente diferente respecto al grupo control (12CM). #: significativamente diferente respecto al grupo 4CM; ∞: significativamente diferente respecto al grupo 12CMS. NS: no significativo. n=7.

2.10. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 meses, desde el destete hasta el sacrificio, sobre los niveles séricos de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos y proteínas totales

Los niveles de triglicéridos en suero se vieron afectados por el tamaño de camada ($F_{(1,23)}$: 4,733; $p < 0,05$), por la ingesta de sacarosa ($F_{(1,23)}$: 5,358; $p < 0,04$) y por la interacción entre ambos factores ($F_{(1,23)}$: 30,479; $p < 0,0001$), estando disminuidos en el grupo 4CM con respecto a los controles (12CM). La ingesta de sacarosa indujo una disminución en los niveles de triglicéridos en ratas procedentes de una camada de tamaño normal (12CMS), pero en ratas con sobrenutrición neonatal (4CMS) incrementaba dichos niveles (Tabla 14).

Los niveles de LDL-colesterol séricos disminuyeron significativamente por la ingesta de sacarosa (LDL-colesterol: $F_{(1,24)}$: 9,673; $p < 0,006$), mientras que los niveles de colesterol total y HDL-colesterol no se vieron afectados por estos factores (Tabla 14).

Los niveles circulantes de ácidos grasos libres y de proteínas totales tampoco se vieron afectados ni por la sobrenutrición ni por la dieta de sacarosa (Tabla 14).

	12 crías/madre		4 crías/madre		p
	Agua	Sacarosa 33%	Agua	Sacarosa 33%	ANOVA 1-vía
Triglicéridos (ng/ml)	95,3 ± 6,2	71,7 ± 7,3*	70,6 ± 9,3*	128,3 ± 6,2* ^{#∞}	p< 0,0001
Colesterol (ng/ml)	59,1 ± 2,8	51,1 ± 2,8	55,3 ± 2,4	51,5 ± 1,8	NS
LDL(ng/ml)	32,2 ± 1,5	26,5 ± 1,6	29,6 ± 2,4	22,5 ± 1,5*	p< 0,005
HDL(ng/ml)	12,6 ± 1,4	18,9 ± 2,0	21,6 ± 2,3	18,4 ± 3,1	NS
Ácidos grasos libres (mM)	1,42 ± 0,12	1,17 ± 0,11	1,13 ± 0,09	1,10 ± 0,07	NS
Proteínas totales (ng/ml)	5,9 ± 0,1	5,8 ± 0,3	5,8 ± 0,1	5,5 ± 0,3	NS

Tabla 14. Niveles de triglicéridos, colesterol, LDL, HDL, ácidos grasos libres y proteínas totales en suero en ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre (CM) y alimentadas desde el destete hasta el sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33%. Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (e.e.m.). *: significativamente diferente respecto al grupo control (12CM); #: significativamente diferente respecto al grupo 4CM; ∞: significativamente diferente respecto al grupo 12CMS. NS: no significativo. n=6.

2.11. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 meses, desde el destete hasta el sacrificio, sobre la morfología de los adipocitos viscerales

El perímetro de los adipocitos del tejido adiposo visceral estaba afectado significativamente por el tamaño de camada ($F_{(1,15)}: 244,514; p<0,0001$) y por la ingesta de sacarosa ($F_{(1,15)}: 18,001; p<0,002$), existiendo interacción entre ambos factores ($F_{(1,15)}: 32,424; p<0,0001$). Todos los grupos presentaban adipocitos de un tamaño significativamente mayor que los controles (12CM). El grupo 4CMS tenía un mayor tamaño de adipocitos que el grupo 12CMS. No se observaron diferencias entre los grupos 4CM y 4CMS (Figura 35).

Además, existió una correlación positiva entre el tamaño de los adipocitos viscerales y los niveles séricos de leptina ($R = 0,667; p<0,01$).

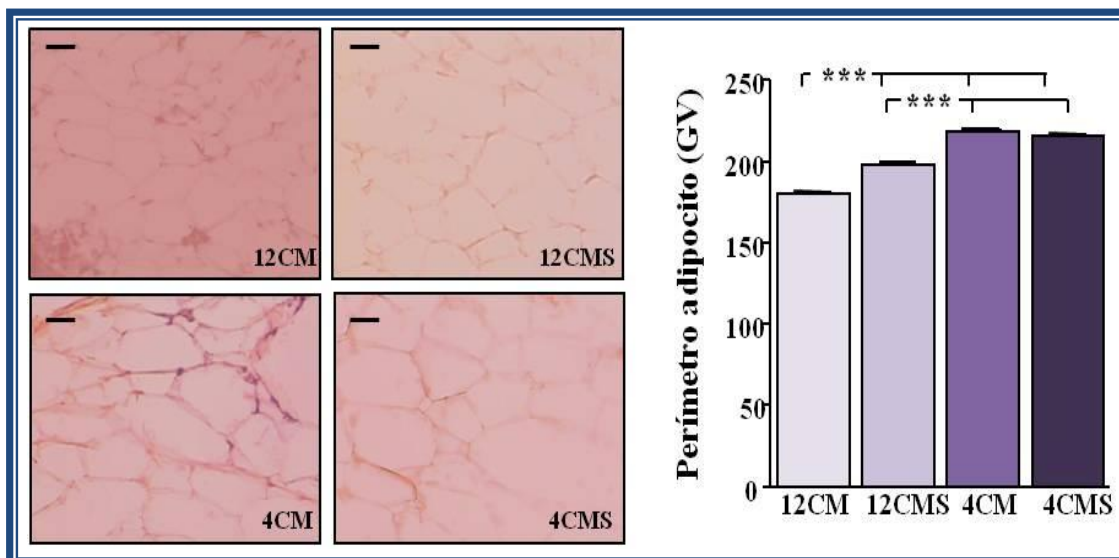


Figura 35. Perímetro (μm) de los adipocitos de la grasa visceral en ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre (CM) y alimentadas desde el destete hasta el sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33% (S). ANOVA: $F_{(3,15)}$: 98,313; $p < 0,0001$. Imágenes del tejido visceral 40X. Escala 10 micras (μm). $n=4$.

2.12. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 meses, desde el destete hasta el sacrificio, sobre los neuropéptidos implicados en la ingesta y el receptor de leptina

Los niveles de ARNm de NPY incrementaron por la ingesta de sacarosa, con independencia del tamaño de camada ($F_{(1,22)}$: 7,874; $p < 0,02$) y los de AgRP estaban afectados por la interacción entre el tamaño de camada y la sacarosa ($F_{(1,22)}$: 5,367; $p < 0,04$), con un incremento en respuesta a la sacarosa (Tabla 15). Los niveles de expresión de los neuropéptidos anorexigénicos POMC y CART no se vieron modificados por estos factores. Los niveles de orexina tampoco se modificaron significativamente (Tabla 15).

Los niveles de expresión del receptor de leptina (ObR) se vieron afectados por la ingesta de sacarosa ($F_{(1,22)}$: 5,388; $p < 0,04$), de manera que el grupo 12CMS presentó unos niveles de expresión del receptor de leptina incrementados con respecto a los del grupo control (Tabla 15).

	12 crías/madre		4 crías/madre		p
	Agua	Sacarosa 33%	Agua	Sacarosa 33%	ANOVA 1-vía
NPY	100 ± 6,7	135,0 ± 16,6*	79,7 ± 8,3	111,7 ± 9,48 [#]	p < 0,04
AGRP	100 ± 9,5	174,2 ± 26,1*	147,0 ± 3,2*	179,4 ± 14,9 [#]	p < 0,03
POMC	100 ± 12,4	134,4 ± 20,7	129,9 ± 15,4	181,2 ± 22,6	NS
CART	100 ± 7,4	134,0 ± 11,1	123,1 ± 19,1	122,1 ± 9,5	NS
Orexina	100 ± 16,6	89,0 ± 13,3	84,3 ± 8,5	55,9 ± 6,4	NS
ObR	100 ± 9,9	118,7 ± 4,5*	111,5 ± 17,4	116,9 ± 6,2	p < 0,04

Tabla 15. Niveles relativos de mensajero de los neuropéptidos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta y del receptor de leptina en el hipotálamo de ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre (CM) y alimentadas desde el destete y hasta el sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33%. Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (e.e.m.). *: significativamente diferente respecto al grupo control (12CM). [∞]: significativamente diferente respecto al grupo 12CMS. NS: no significativo. n=5.

3. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de una dieta rica en sacarosa sobre los astrocitos y los transportadores de glucosa y de glutamato hipotalámicos

3.1. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los niveles de proteínas estructurales del hipotálamo

Los niveles proteicos de GFAP se encontraban incrementados en el grupo 4CM respecto al grupo control (12CM) ($F_{(1,16)}$: 12,420; $p < 0,04$) y estaban afectados por la ingesta de la dieta rica en sacarosa ($F_{(1,16)}$: 5,340; $p < 0,04$), la cual disminuyó los niveles de GFAP en ratas con sobrenutrición neonatal, sin observarse este efecto en las ratas control (las procedentes de camadas de 12 crías) (Tabla 16). Los niveles proteicos de β -actina se encontraban incrementados en los grupos de 4 crías con independencia de la dieta que llevasen ($F_{(1,16)}$: 44,595; $p < 0,0001$) (Tabla 16). Los niveles de vimentina estaban afectados significativamente por la interacción entre el tamaño de camada y la dieta ($F_{(1,16)}$: 23,283; $p < 0,001$), encontrándose incrementados en ratas con sobrenutrición neonatal comparados con sus controles (12CM). La ingesta de sacarosa en ratas procedentes de camadas normales incrementó los niveles hipotalámicos de vimentina, mientras que en las ratas con sobrenutrición neonatal la ingesta de sacarosa

los disminuyó con respecto al grupo 4CM (Tabla 16). Existió una interacción entre el tamaño de camada y la ingesta de sacarosa en los niveles proteicos de PCNA en el hipotálamo ($F_{(1,13)}$: 5,603; $p < 0,04$) (Tabla 16).

	12 crías/madre		4 crías/madre		p
	Agua	Sacarosa 33%	Agua	Sacarosa 33%	ANOVA 1-vía
GFAP	100 ± 9,5	96,4 ± 7,9	146,6 ± 29,2*	88,3 ± 10,5 [#]	p < 0,04
β-ACTINA	100 ± 4,9	100 ± 13,3	129,1 ± 2,9*	123,9 ± 2,5*	p < 0,0001
VIMENTINA	100 ± 7,1	232,4 ± 22,1*	197,2 ± 41,9*	122,8 ± 16,4 [#]	p < 0,001
PCNA	100 ± 8,2	102,3 ± 7,9	113,0 ± 5,3	77,4 ± 7,7	NS

Tabla 16. Niveles proteicos relativos de GFAP, β-actina, vimentina y PCNA medidos por WB en el hipotálamo de ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre y alimentadas durante dos semanas con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33%. Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (e.e.m.). *: significativamente diferente respecto al grupo control (12CM); [#]: significativamente diferente respecto al grupo 4CM. NS: no significativo. n=5.

3.2. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los transportadores de glucosa y de glutamato del hipotálamo

En el hipotálamo, tanto los niveles proteicos como los niveles de ARNm de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3 se encontraban incrementados por efecto de la sobrenutrición neonatal en los grupos de 4 crías, con independencia de la dieta (Niveles proteicos: GLUT-1: $F_{(1,16)}$: 14.470; $p < 0.003$; GLUT-3: $F_{(1,16)}$: 10.893; $p < 0.01$; ARNm: GLUT-1: $F_{(1,17)}$: 7,047; $p < 0,02$; GLUT-3: $F_{(1,17)}$: 7,923; $p < 0,02$). En el caso de GLUT-2 sus niveles proteicos se vieron afectados por la dieta ($F_{(1,16)}$: 11,661; $p < 0,006$), existiendo una interacción entre el tamaño de camada y la ingesta de sacarosa en dichos niveles. Los niveles de mensajero de este transportador también se vieron afectados tanto por la dieta ($F_{(1,17)}$: 6,604; $p < 0,03$), como por el tamaño de camada ($F_{(1,17)}$: 12,599; $p < 0,005$), estando los niveles incrementados en los grupos alimentados con sacarosa y disminuídos en los grupos de 4 crías (Figura 36).

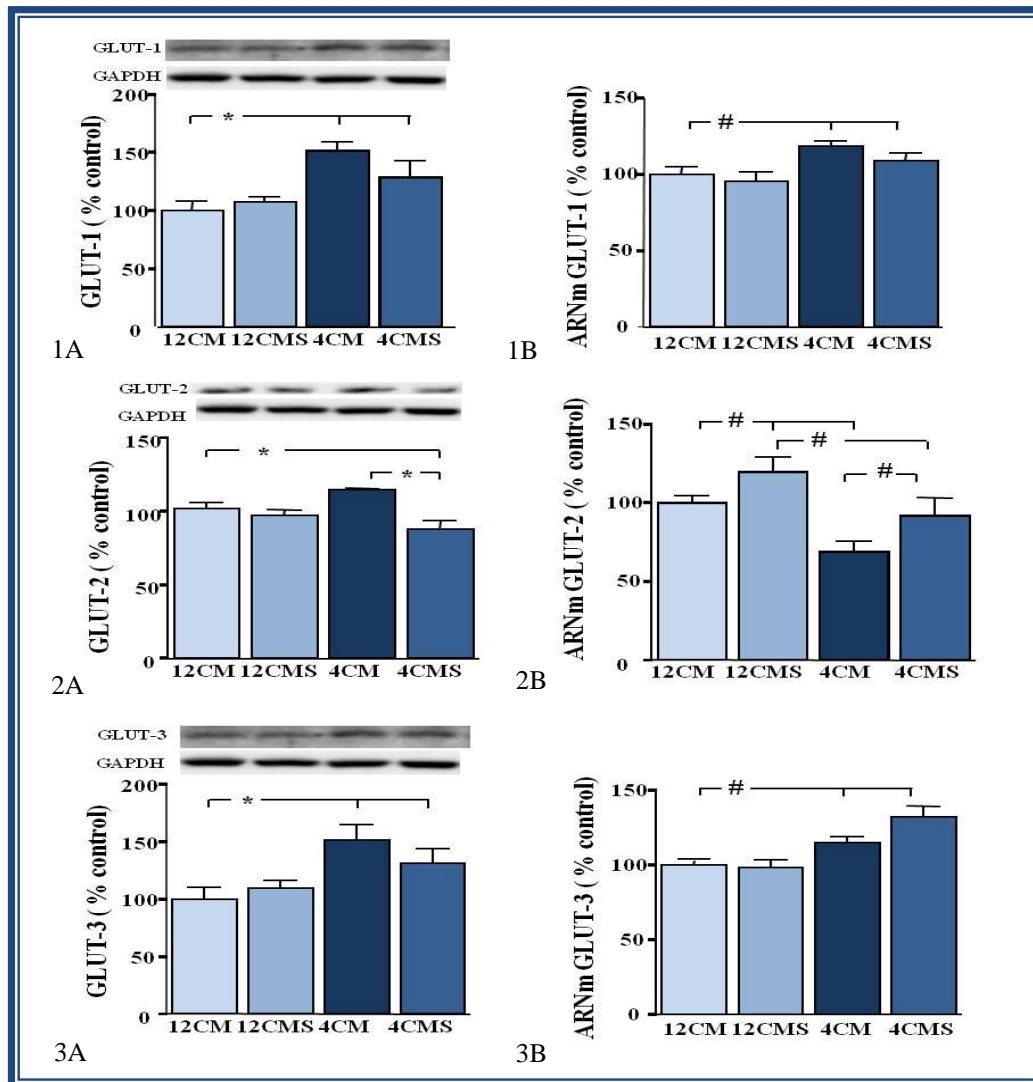


Figura 36. Niveles proteicos relativos de GLUT-1 (1A), GLUT-2 (2A) y GLUT-3 (3A) medidos por WB y niveles relativos de ARN mensajero de GLUT-1 (1B), GLUT-2 (2B) y GLUT-3 (3B) determinados por *RT-PCR* en el hipotálamo de ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre (CM) y alimentadas durante dos semanas con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33% (S). ANOVA: niveles proteicos GLUT-1: $F_{(3,16)}: 5,389$; $p < 0,05$; GLUT-2: $F_{(3,16)}: 5,004$; $p < 0,05$; GLUT-3: $F_{(3,16)}: 4,034$; $p < 0,05$. ARNm GLUT-1: $F_{(3,17)}: 2,607$; $p < 0,05$; GLUT-2: $F_{(3,17)}: 5,548$; $p < 0,05$; GLUT-3: $F_{(3,17)}: 3,489$; $p < 0,05$. $n=5$.

Los niveles proteicos de GLAST incrementaron por efecto del tamaño de la camada ($F_{(1,15)}: 5,65$; $p < 0,04$) y por la ingesta de sacarosa ($F_{(1,15)}: 10,032$; $p < 0,009$). Además, existió una interacción entre ambos factores ($F_{(1,15)}: 8,498$; $p < 0,02$) (Figura 37A). Las dos isoformas de GLT-1 se vieron igualmente afectadas por el tamaño de camada (GLT-1.75: $F_{(1,16)}: 19,988$; $p < 0,002$; GLT-1.51: $F_{(1,16)}: 13,324$; $p < 0,004$) y por la ingesta de sacarosa (GLT-1.75: $F_{(1,16)}: 10,471$; $p < 0,008$; GLT-1.51: $F_{(1,16)}: 11,214$; $p < 0,006$), estando incrementados sus niveles en los grupos grupos de 4 crías y en los grupos alimentados con sacarosa (Figura 37B y 37C).

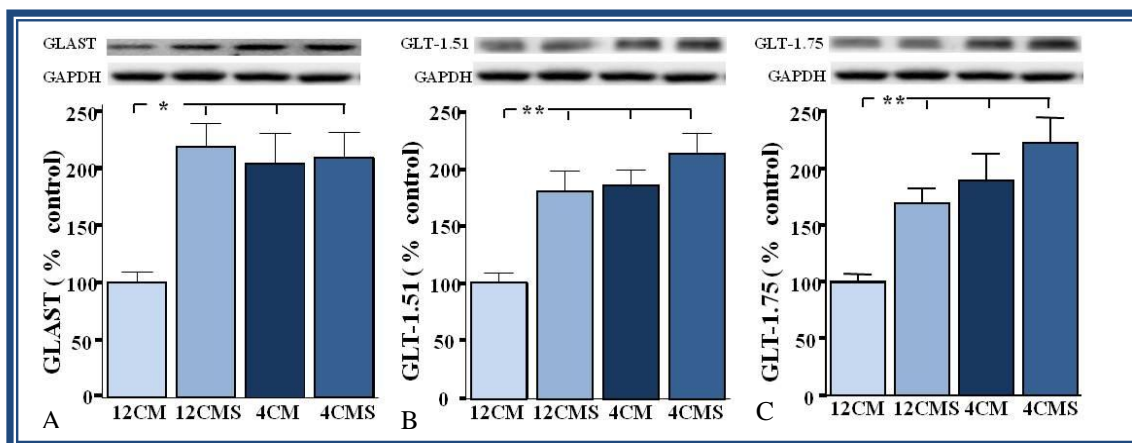


Figura 37. Niveles proteicos relativos de GLAST (A) y de las dos isoformas de GLT-1(B,C) medidos por WB en el hipotálamo de ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre (CM) y alimentadas durante dos semanas con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33% (S). ANOVA: GLAST: $F_{(3,15)}: 9,622$; $p < 0,01$; GLT-1.75: $F_{(3,16)}: 11,757$; $p < 0,001$; GLT-1.51: $F_{(3,16)}: 10,267$; $p < 0,001$. $n=5$.

Los niveles proteicos de glutamina sintetasa (GS) estaban modificados por la interacción entre el tamaño de camada y la dieta ($F_{(1,16)}: 6,776$; $p < 0,03$), estando incrementados los niveles en los grupos 4CM y 12CMS respecto a los controles 12CM. Por el contrario, estaban disminuídos en el grupo 4CMS con respecto al grupo de 4CM sin sacarosa (ANOVA 1-vía: $F_{(3,16)}: 3,715$; $p < 0,05$; 12CM: $100 \pm 2,4$; 12CMS: $116,1 \pm 4,1$; 4CM: $123,3 \pm 5,7$; 4CMS: $112,7 \pm 7,9$ % control).

3.3. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 meses, desde el destete y hasta el sacrificio, sobre proteínas estructurales del hipotálamo y sobre la morfología y número de los astrocitos hipotalámicos

Los niveles proteicos de GFAP en el hipotálamo estaban incrementados en el grupo 4CM con respecto a los controles ($F_{(1,22)}: 4,693$; $p < 0,05$). Además, existía un efecto de la sacarosa sobre los niveles de este marcador astrocitario, estando los niveles proteicos disminuidos en ambos grupos de ratas alimentadas con sacarosa con respecto a los grupos alimentados con dieta normal ($F_{(1,22)}: 21,754$; $p < 0,0001$) (Tabla 17). Los niveles proteicos de β -actina se vieron afectados por la interacción entre el tamaño de camada y el azúcar ($F_{(1,22)}: 23,800$; $p < 0,0001$), resultando en un incremento de los niveles de β -actina en el grupo 4CM con respecto al grupo 12CM y una disminución de los niveles de β -actina en el grupo 4CMS, respecto a los grupos 12CMS y 4CM (Tabla 17).

Los niveles de vimentina estaban afectados por la sobrenutrición neonatal ($F_{(1,22)}$: 8,966; $p < 0,008$) y por la interacción entre el tamaño de camada y la dieta ($F_{(1,22)}$: 16,726; $p < 0,002$), resultando en unos niveles incrementados en los grupos 12CMS y 4CM, con respecto a al grupo control (Tabla 17). Los niveles de PCNA en el hipotálamo disminuyeron por efecto de la sacarosa, con independencia del tamaño de camada ($F_{(1,22)}$: 5,807; $p < 0,03$) (Tabla 17).

	12 crías/madre		4 crías/madre		p
	Agua	Sacarosa 33%	Agua	Sacarosa 33%	ANOVA 1-vía
GFAP	100 ± 11,1	62,6 ± 6,6*	120,7 ± 5,2*	78,7 ± 2,6 [#]	p < 0,0001
β-ACTINA	100 ± 4,2	119,6 ± 5,3	123,3 ± 7,1*	92,9 ± 2,8 ^{#∞}	p < 0,001
VIMENTINA	100 ± 1,5	119,0 ± 4,2	132,0 ± 3,8*	114,2 ± 7,0	p < 0,001
PCNA	100 ± 4,9	86,2 ± 11,1*	106,2 ± 4,9	81,6 ± 2,1 ^{*#}	p < 0,05

Tabla 17. Niveles proteicos relativos de GFAP, β-actina, vimentina y PCNA medidos por WB en el hipotálamo de ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre y alimentadas desde el destete hasta el sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33%. Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (e.e.m.). *: significativamente diferente respecto al grupo control (12CM); #: significativamente diferente respecto al grupo 4CM; ∞: significativamente diferente respecto al grupo 12CMS. n=6.

Al analizar la morfología y el número de astrocitos GFAP⁺ en el núcleo arcuato del hipotálamo, se observó un incremento en el número de astrocitos por campo ($F_{(1,9)}$: 21,34; $p < 0,005$) y un incremento en el número de proyecciones por astrocito ($F_{(1,9)}$: 9,609; $p < 0,03$) en las ratas con sobrenutrición neonatal y dieta normal. La dieta rica en sacarosa durante 2 meses disminuyó tanto el número de astrocitos ($F_{(1,9)}$: 38,475; $p < 0,002$) como el número de proyecciones por astrocito ($F_{(1,9)}$: 74,79; $p < 0,0001$). Además, en ambas variables existió interacción entre el tamaño de la camada y la dieta rica en sacarosa (número astrocitos: $F_{(1,9)}$: 28,225; $p < 0,002$; número proyecciones: $F_{(1,9)}$: 7,77; $p < 0,04$). La longitud de las proyecciones también se modificó en estos animales, disminuyendo por la sobrenutrición neonatal ($F_{(1,9)}$: 6,507; $p < 0,05$) y por la dieta rica en sacarosa ($F_{(1,9)}$: 12,96; $p < 0,02$) (Figura 38).

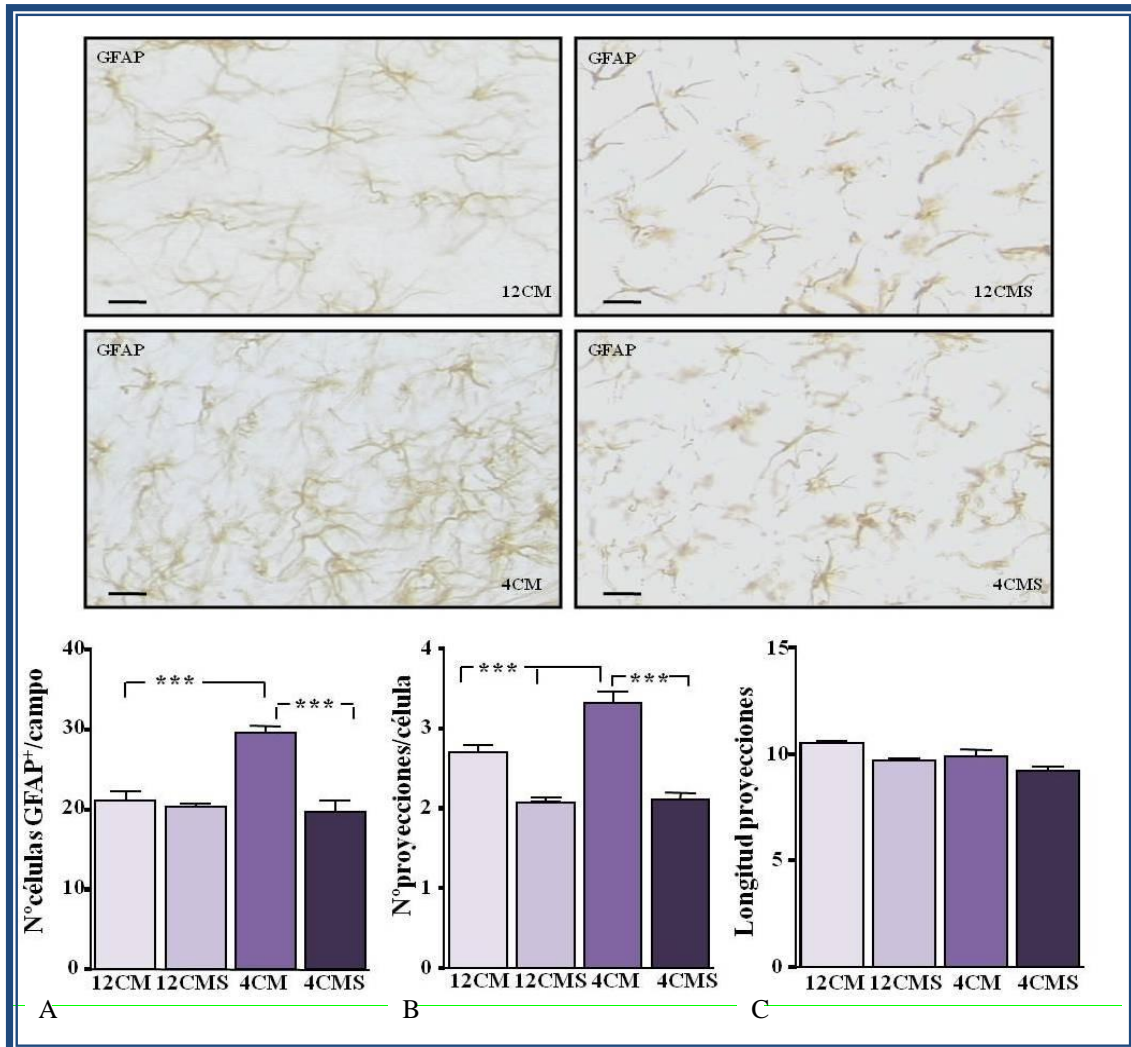


Figura 38. Microfotografías de células inmunoreactivas para GFAP en el núcleo arcuato del hipotálamo de ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías alimentadas desde el destete hasta el sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33%. Escala 10 micras (μm). Número de células GFAP⁺/campo, número de proyecciones/astrocito y longitud (μm) de las proyecciones en el núcleo arcuato del hipotálamo. ANOVA: N° células GFAP⁺/campo $F_{(3,9)}$: 34,157; $p < 0,0001$. N° proyecciones/célula: $F_{(3,9)}$: 35,618; $p < 0,0001$; $F_{(3,9)}$: 5,55; $p < 0,05$. $n=4$.

3.4. Efecto de la sobrenutrición neonatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 meses, desde el destete hasta el sacrificio, sobre los transportadores de glucosa y de glutamato en el hipotálamo

Los niveles proteicos de los transportadores GLUT-1, GLUT-2 y GLUT-3 se vieron afectados por el tamaño de camada (GLUT-1: $F_{(1,22)}$: 16,863; $p < 0,002$; GLUT-2: $F_{(1,22)}$: 9,912; $p < 0,006$; GLUT-3: $F_{(1,22)}$: 14,684; $p < 0,002$), estando incrementados en el grupo 4CM con respecto al grupo 12CM. Mientras que los niveles proteicos de GLUT-2 se vieron afectados por la dieta ($F_{(1,22)}$: 6,439; $p < 0,03$), siendo mayores sus niveles en el grupo de 4CM respecto al control y menores en ambos grupos alimentados con sacarosa respecto a sus controles, no se encontró efecto significativo de la dieta sobre los niveles

GLUT-1 y GLUT-3. Existió una interacción entre el tamaño de camada y la ingesta de sacarosa sobre los niveles de mensajero de GLUT-1 ($F_{(1,22)}$: 4,620; $p < 0,05$) y GLUT-2 ($F_{(1,22)}$: 6,666; $p < 0,03$), estando incrementados los niveles de mensajero de estos dos transportadores en el grupo de 12CMS y 4CM respecto al grupo control. En los niveles de ARNm de GLUT-3 no hubo diferencias significativas entre los grupos. (Figura 39).

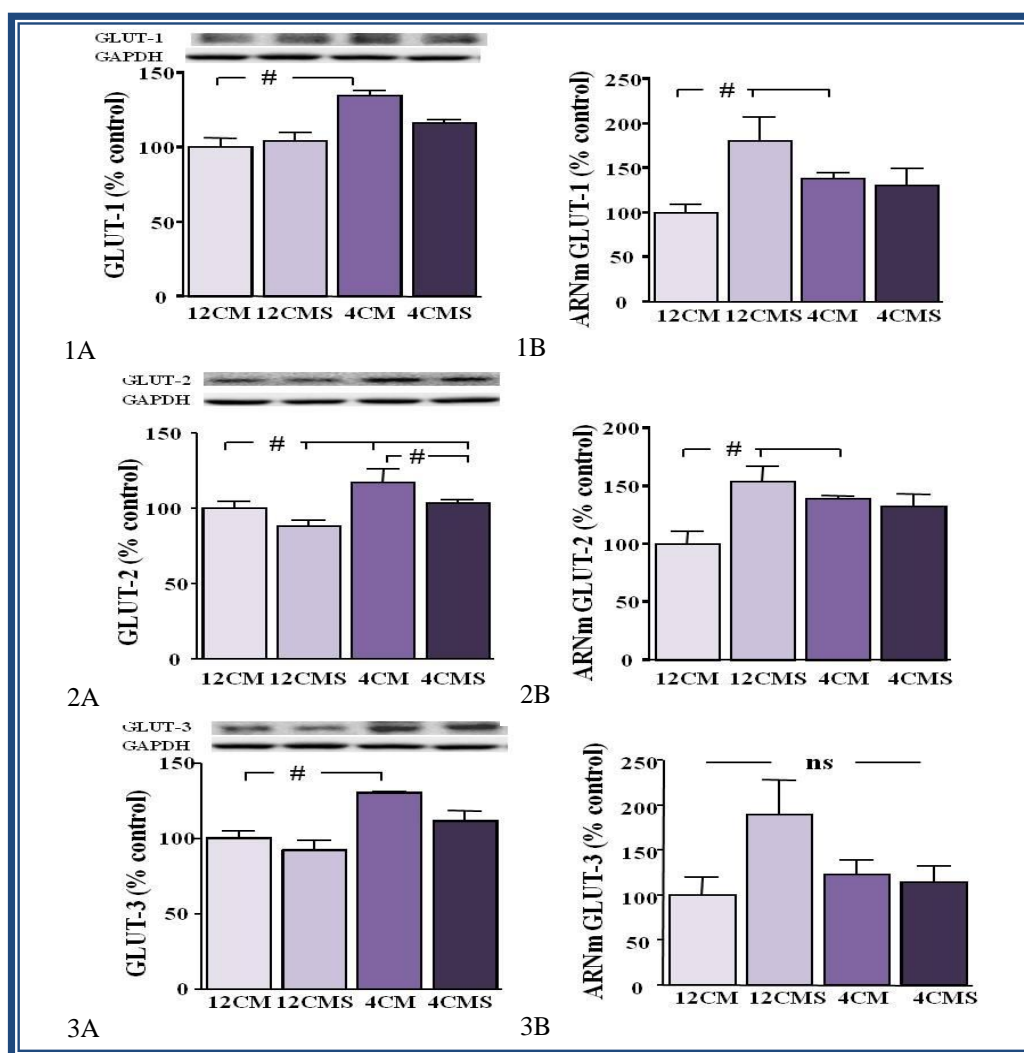


Figura 39. Niveles proteicos relativos de GLUT-1 (1A), GLUT-2 (2A) y GLUT-3 (3A) medidos por WB y niveles relativos de ARN mensajero de GLUT-1 (1B), GLUT-2 (2B) y GLUT-3 (3B) determinados por *RT-PCR* en el hipotálamo de ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre (CM) y alimentadas desde el destete hasta el sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33% (S). ANOVA: niveles proteicos GLUT-1: $F_{(3,22)}$: 6,650; $p < 0,01$; GLUT-2: $F_{(3,22)}$: 5,220; $p < 0,05$; GLUT-3: $F_{(3,22)}$: 5,988. ARNm GLUT-1: $F_{(3,22)}$: 3,327; $p < 0,05$; GLUT-2: $F_{(3,22)}$: 3,996; $p < 0,05$ GLUT-3: $F_{(3,22)}$: 2,382; ns: no significativo. $n=6$.

Los niveles proteicos del transportador de glutamato GLAST estaban incrementados por la sobrenutrición neonatal ($F_{(1,19)}$: 6,915; $p < 0,04$) y disminuídos por la sacarosa ($F_{(1,19)}$: 11,684; $p < 0,004$). Además, existía una interacción entre ambos factores ($F_{(1,19)}$: 7,210; $p < 0,02$) (Figura 40A). En el caso del transportador de glutamato

GLT-1, sus dos isoformas estaban afectadas por el tamaño de camada (GLT-1.75: $F_{(1,22)}$: 9.236; $p < 0.008$; GLT-1.51: $F_{(1,22)}$: 8.463; $p < 0.01$) (Figura 40B y 40C). Los niveles proteicos de glutamina sintetasa no se vieron afectados significativamente por estos parámetros (12CM: $100 \pm 4,2$; 12CMS: $90,1 \pm 9,7$; 4CM: $78,0 \pm 4,4$; 4CMS: $87,5 \pm 7,9$ % control).

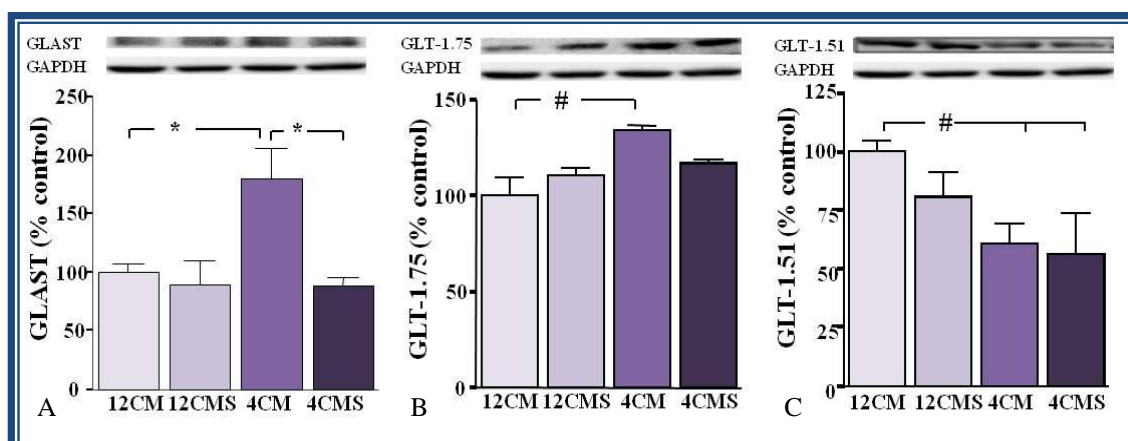


Figura 40. Niveles proteicos relativos de GLAST y de las dos isoformas de GLT-1 medidos por WB en el hipotálamo de ratas macho procedentes de camadas de 12 ó 4 crías por madre y alimentadas desde el destete hasta el sacrificio con pienso de rata *ad libitum* y agua o una solución de sacarosa al 33% (S). ANOVA: GLAST: $F_{(3,19)}$: 6,357; $p < 0,01$; GLT-1.75: $F_{(3,22)}$: 4,262; $p < 0,05$; GLT-1.51: $F_{(3,22)}$: 3,581; $p < 0,05$. $n=6$.

4. Efecto de la ghrelina y de la leptina sobre los astrocitos y los transportadores de glucosa y de glutamato hipotalámicos

En los resultados descritos anteriormente se observaron cambios en los niveles circulantes de leptina y de ghrelina, hormonas implicadas en el metabolismo energético, razón por la cual se realizaron varios estudios para determinar el efecto de la administración de estas hormonas sobre las células gliales y los transportadores de glucosa y de glutamato. Igualmente, para determinar cómo un cambio fisiológico de los niveles circulantes de las hormonas metabólicas (ghrelina, leptina e insulina) afecta los niveles hipotalámicos de los transportadores de glucosa y de glutamato, se realizó el estudio de ratas Wistar sacrificadas tras 12 ó 24 horas de ayuno.

4.1. Efecto del ayuno

4.1.1. Efecto del ayuno sobre los niveles séricos de hormonas metabólicas

El ayuno indujo una disminución de los niveles circulantes de insulina y esta disminución alcanzó la significación estadística tras 24 horas de ayuno ($F_{(2,28)}$: 5,379; $p < 0,03$). Igualmente, los niveles séricos de leptina disminuyeron por efecto de un ayuno de 12 y 24 horas ($F_{(2,28)}$: 130,360; $p < 0,0001$) (Tabla 18).

Por el contrario, los niveles séricos de ghrelina total incrementaron por efecto del ayuno ($F_{(2,19)}$: 18,321; $p < 0,0001$). No hubo diferencias en los niveles de ghrelina acilada entre los grupos, pero el ayuno de 12 horas disminuyó el porcentaje de acilación de esta hormona ($F_{(2,19)}$: 6,581; $p < 0,01$) (Tabla 18).

	Control	Ayuno 12h	Ayuno 24h	ANOVA 1-vía
Insulina (ng/ml)	1,01 ± 0,28	0,43 ± 0,15	0,19 ± 0,01*	p < 0,03
Leptina (ng/ml)	7,11 ± 0,43	0,95 ± 0,18*	1,32 ± 0,22*	p < 0,0001
Ghrelina total (pg/ml)	729,6 ± 32,4	1174,4 ± 78,4*	854,0 ± 44,1 [#]	p < 0,0001
Ghrelina acilada (pg/ml)	195,7 ± 13,1	188,6 ± 20,9	186,1 ± 13,6	NS
Porcentaje acilación	27,1 ± 2,1	16,8 ± 2,7*	22,2 ± 1,0	p < 0,01

Tabla 18. Niveles de insulina, leptina, ghrelina total, ghrelina acilada y porcentaje de acilación de ghrelina en el suero de las ratas macho sacrificadas después de 12 ó 24 horas de ayuno o con comida *ad libitum* (grupo control). Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (e.e.m.). ANOVA: *: significativamente diferente respecto al grupo control; #: significativamente diferente comparado con el grupo de ayuno 24 horas. NS= no significativo. n=7.

4.1.2. Efecto del ayuno sobre las proteínas estructurales y los transportadores de glucosa y de glutamato hipotalámicos

Se analizaron los niveles hipotalámicos de distintos marcadores gliales y de proliferación celular por *Western blotting* y se observó que el ayuno incrementó los niveles de GFAP (Ct: 100 ± 3,3; ayuno 12h: 110,1 ± 1,5; ayuno 24h: 117,5 ± 5,3 % control. $F_{(2,17)}$: 5,528; $p < 0,02$). Por el contrario, el ayuno disminuyó los niveles proteicos de vimentina (Ct: 100 ± 10,4; ayuno 12h: 50,6 ± 8,2; ayuno 24h: 48,8 ± 13,10 % control. $F_{(2,17)}$: 7,230; $p < 0,007$). Los niveles de PCNA incrementaron tras 24 horas de ayuno (Ct: 100 ± 2,7; ayuno 12h: 100,1 ± 5,0; ayuno 24h: 112,8 ± 2,4 % control. $F_{(2,17)}$:

4,198; $p < 0,04$). Los niveles proteicos de β -actina no se modificaron (Ct: $100 \pm 7,6$; ayuno 12h: $107,1 \pm 9,5$; ayuno 24h: $94,8 \pm 4,5$ % control).

El ayuno incrementó significativamente los niveles proteicos de GLUT-1 ($F_{(2,17)}$: 9,587; $p < 0,003$) y GLUT-3 ($F_{(2,17)}$: 5,412; $p < 0,02$) en el hipotálamo. Por el contrario, los niveles hipotalámicos de GLUT-2 disminuyeron por efecto del ayuno ($F_{(2,17)}$: 5,999; $p < 0,02$) (Figura 41).

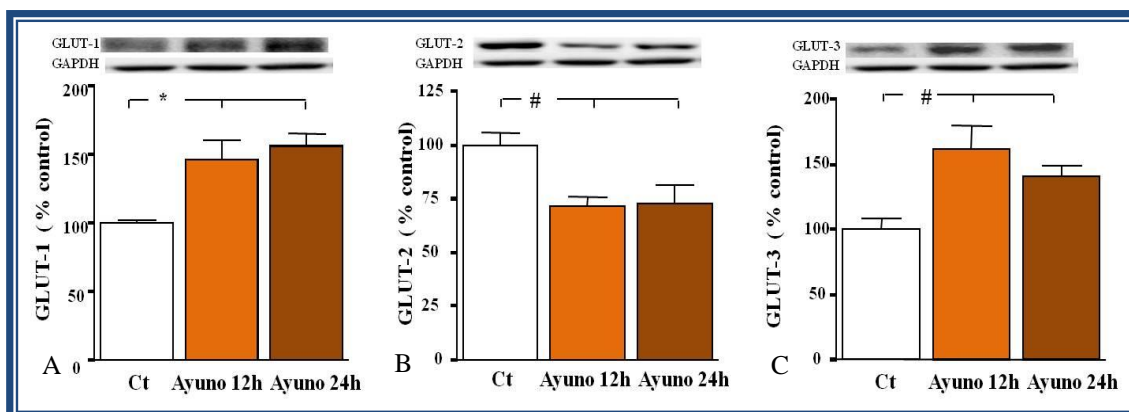


Figura 41. Niveles proteicos relativos de GLUT-1 (A), GLUT-2 (B) y GLUT-3 (C) medidos por WB en el hipotálamo de ratas macho sacrificadas después de 12 ó 24 horas de ayuno o con comida *ad libitum* (grupo control). ANOVA: #: $p < 0,05$; *: $p < 0,01$. $n=6$.

El ayuno incrementó los niveles del transportador de glutamato GLAST ($F_{(2,17)}$: 12,581; $p < 0,002$) (Figura 42), pero modificó los niveles de las dos isoformas de GLT-1 (GLT-1.51: Ct: $100 \pm 4,5$; ayuno 12h: $102,4 \pm 4,9$; ayuno 24h: $109,5 \pm 6,5$ % control; GLT-1.75: Ct: $100 \pm 7,2$; ayuno 12h: $93,7 \pm 6,4$; ayuno 24h: $106,5 \pm 11,7$ % control). Los niveles de GS tampoco se vieron modificados por el ayuno (Ct: $100 \pm 4,6$; ayuno 12h: $98,2 \pm 4,5$; ayuno 24h: $96,4 \pm 3,4$ % control).

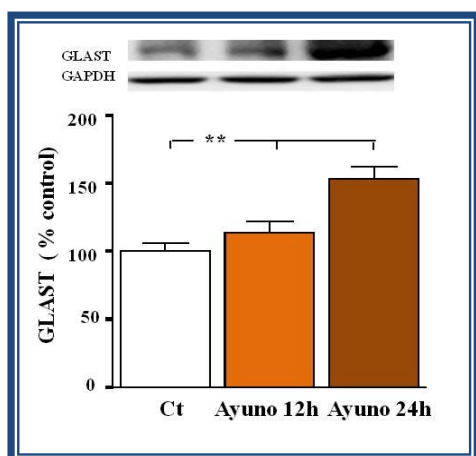


Figura 42. Niveles proteicos relativos de GLAST medidos por WB en el hipotálamo de ratas macho sacrificadas después de 12 ó 24 horas de ayuno o con comida *ad libitum* (grupo control). ANOVA: **: $p < 0,001$. $n=6$.

4.2. Efecto de la exposición central y crónica de ghrelina

4.2.1. Efecto de la administración central y crónica de ghrelina sobre la ingesta, el peso corporal y los depósitos de grasa y músculo

Se registraron las variaciones de peso corporal que experimentaron las ratas con el tratamiento, desde el momento de la implantación de las bombas osmóticas hasta el sacrificio. El grupo de ratas tratadas con ghrelina con acceso a la comida *ad libitum* (a partir de ahora denominado grupo ghrelina, (G), presentó una ganancia de peso mayor que las ratas control y que aquellas a las que se trató también con ghrelina pero que fueron sometidas a una restricción de la ingesta, limitándola a la cantidad consumida por los controles (a partir de ahora, ghrelina *pair-fed*, G *pair-fed*) ($F_{(2,34)}$: 6,664; $p < 0,005$) (Tabla 19). Además, la ingesta media diaria estaba incrementada en el grupo tratado con ghrelina con respecto a los controles y al grupo de ghrelina *pair-fed* ($F_{(2,15)}$: 17,416; $p < 0,0001$) (Tabla 19).

Las ratas del grupo ghrelina presentaron mayores depósitos de grasa subcutánea y visceral que las ratas control (valores referidos al peso corporal de la rata) (GSC: $F_{(2,28)}$: 12,147; $p < 0,0001$; GV: $F_{(2,28)}$: 6,854; $p < 0,005$). El grupo ghrelina *pair-fed* también presentó unos niveles de grasa visceral incrementados con respecto a las ratas control. Sin embargo, los depósitos de grasa subcutánea eran similares a los de los controles, sin detectarse el incremento observado en el grupo de ghrelina con comida *ad libitum* (Tabla 19).

	Control	Ghrelina	Ghrelina <i>pair-fed</i>	ANOVA
Δ Peso (g)	30,1 \pm 4,5	51,4 \pm 5,7*#	26,6 \pm 4,0	$p < 0,005$
Ingesta 24h	46,9 \pm 1,3	55,2 \pm 1,7*#	43,2 \pm 0,8	$p < 0,0001$
Peso grasa subcutánea/peso corporal (g)	0,4 \pm 0,03	0,6 \pm 0,05*#	0,3 \pm 0,03	$p < 0,0001$
Peso grasa visceral/peso corporal (g)	1,0 \pm 0,07	1,4 \pm 0,13*	1,4 \pm 0,06*	$p < 0,005$

Tabla 19. Incremento de peso corporal, ingesta media diaria y peso de la grasa subcutánea y visceral en ratas tratadas durante 14 días con ghrelina *icv*. Los valores se muestran como media \pm error estándar de la media (e.e.m.). ANOVA *: significativamente diferente respecto al grupo control; #: significativamente diferente comparado con el grupo ghrelina *pair-fed*.

4.2.2. Efecto de la administración central y crónica de ghrelina sobre los niveles séricos de hormonas metabólicas y sobre los neuropéptidos hipotalámicos implicados en la ingesta

Los niveles de glucosa en sangre en el momento de sacrificio no se encontraron modificados por el tratamiento con ghrelina (Tabla 20), el cual tampoco incidió en los niveles de insulina y adiponectina en suero (Tabla 20).

El grupo de ratas tratadas con ghrelina presentó mayores niveles circulantes de leptina que el grupo control y que el grupo de ghrelina *pair-fed* ($F_{(2,19)}: 7,169$; $p < 0,006$) (Tabla 20). Los niveles séricos de ghrelina total estaban incrementados en ambos grupos tratados con ghrelina con respecto al grupo control, sin encontrar diferencias entre el grupo con comida *ad libitum* y el grupo *pair-fed* ($F_{(2,36)}: 8,501$; $p < 0,001$). El porcentaje de acilación de esta hormona no se vio afectada por el tratamiento (Tabla 20).

	Control	Ghrelina	Ghrelina <i>pair-fed</i>	ANOVA
Glucemia (mg/dl)	92,7 ± 2,2	95,6 ± 2,2	87,4 ± 3,3	NS
Insulina (ng/ml)	1,9 ± 0,3	2,8 ± 0,4	2,1 ± 0,3	NS
Leptina (ng/ml)	4,9 ± 0,7	10,3 ± 1,7* [#]	4,9 ± 0,6	p < 0,005
Adiponectina (ng/ml)	31,3 ± 2,8	42,3 ± 5,2	39,4 ± 4,8	NS
Ghrelina total(GT) (pg/ml)	1444,7 ± 128,7	2271,1 ± 228,5*	3237,1 ± 580,5*	p < 0,004
Ghrelina acilada(GA) (pg/ml)	129,6 ± 9,4	168,5 ± 33,6	218,5 ± 51,76	NS
Ratio GA / GT (%)	9,9 ± 1,0	7,4 ± 1,0	8,5 ± 2,0	NS

Tabla 20. Variación de los niveles de glucosa en sangre y niveles de insulina, leptina, adiponectina, ghrelina total, ghrelina acilada y porcentaje de acilación de ghrelina en el suero de las ratas tratadas durante 14 días con ghrelina *icv*. Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (e.e.m.). ANOVA: *: significativamente diferente respecto al grupo control; #: significativamente diferente comparado con el grupo ghrelina *pair-fed*. NS= no significativo. Glucemia: realizado a todos los animales del estudio. Hormonas: n=8.

El tratamiento no tuvo ningún efecto sobre la expresión génica de los neuropéptidos hipotalámicos implicados en el metabolismo energético, ni sobre los orexigénicos: NPY (Ct: 100 ± 2,9; G: 92,8 ± 3,7; G *pair-fed*: 97,2 ± 11,3 % control) y AgRP (Ct: 100 ± 5,8; G: 124,6 ± 8,6; G *pair-fed*: 106,5 ± 16,9 % control) ni sobre los

anorexigénicos: POMC (Ct: $100 \pm 10,1$; G: $118,4 \pm 7,2$; G *pair-fed*: $80,7 \pm 14,7$ % control) y CART (Ct: $100 \pm 6,7$; G: $125,6 \pm 6,4$; G *pair-fed*: $102,4 \pm 10,9$ % control) .

4.2.3. Efecto de la administración central y crónica de ghrelina sobre las proteínas estructurales y sobre los transportadores de glucosa y de glutamato en el hipotálamo

Se analizaron los niveles proteicos hipotalámicos de distintos marcadores gliales y de proliferación celular (GFAP, vimentina, PCNA y β -actina) por *Western blotting* y se observó que la administración de ghrelina, con independencia de la restricción o no de comida suministrada a las ratas, disminuyó los niveles de GFAP (Ct: $100 \pm 5,1$; G: $62,4 \pm 4,2$; G *pair-fed*: $52,7 \pm 13,6$ % control. $F_{(2,11)}: 10,378$; $p < 0,004$), sin existir diferencias significativas entre ambos grupos tratados con ghrelina. La ghrelina no modificó los niveles de vimentina (Ct: $100 \pm 16,1$; G: $133,8 \pm 11,6$; G *pair-fed*: $137,6 \pm 33,9$ % control), de PCNA (Ct: $100 \pm 10,6$; G: $115,1 \pm 4,2$; G *pair-fed*: $130,5 \pm 10,2$ % control) o de β -actina (Ct: $100 \pm 13,6$; G: $73,5 \pm 10,6$; G *pair-fed*: $101,8 \pm 16,5$ % control) en el hipotálamo.

El tratamiento con ghrelina tampoco modificó los niveles proteicos de GLUT-1 en el hipotálamo (Ct: $100 \pm 6,2$; G: $122,5 \pm 6,6$; G *pair-fed*: $130,1 \pm 15,9$), sin embargo disminuyó los niveles de GLUT-2 y GLUT-3 en ratas tratadas con ghrelina y alimentadas con comida *ad libitum* (GLUT-2: $F_{(2,13)}: 4,887$; $p < 0,04$; GLUT-3: $F_{(2,13)}: 5,609$; $p < 0,03$). Los niveles de GLUT-2 y GLUT-3 en el grupo *pair-fed* no cambiaron con respecto a los controles (Figura 43).

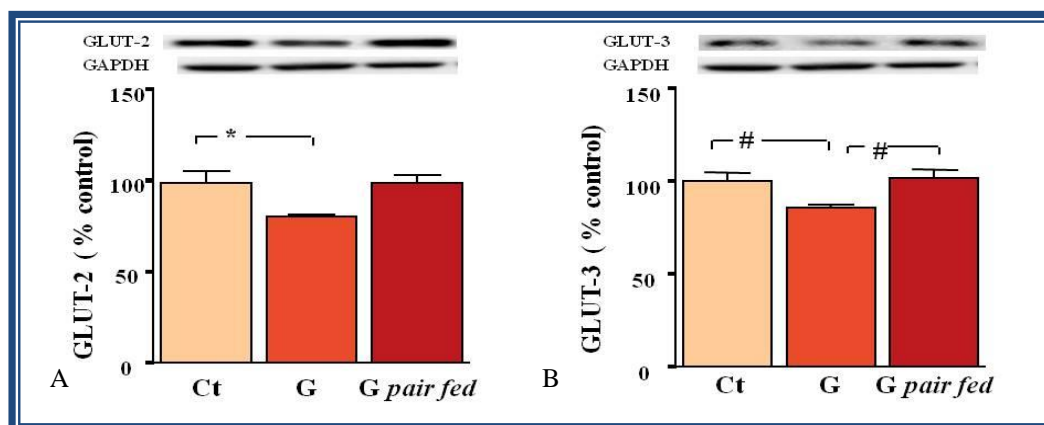


Figura 43. Niveles proteicos relativos de GLUT-2 (A) y GLUT-3 (B) medidos por WB en el hipotálamo de ratas macho tratadas con durante 14 días con ghrelina *icv* y comida *ad libitum* (G) ó con restricción de comida (*pair-fed*). ANOVA: #: $p < 0,05$; *: $p < 0,01$. Ct y G: $n=6$; G *pair-fed*: $n=4$.

El tratamiento central y crónico con ghrelina incrementó los niveles de los transportadores de glutamato analizados en el grupo de ratas con comida *ad libitum* (GLAST: $F_{(2,13)}$: 14,690; $p < 0,002$; GLT-1.51: $F_{(2,13)}$: 4,572; $p < 0,04$; GLT-1.75: $F_{(2,13)}$: 7,202; $p < 0,02$), sin observarse este efecto en el grupo de ghrelina *pair-fed* (Figura 44).

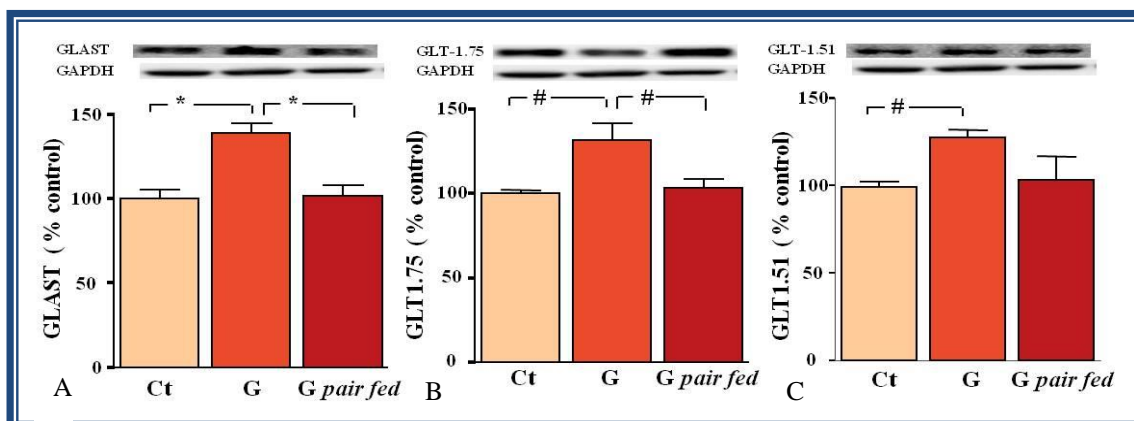


Figura 44. Niveles proteicos relativos de GLAST (A) y GLT-1 (B y C) medidos por WB en el hipotálamo de ratas macho tratadas durante 14 días con ghrelina *icv* y comida *ad libitum* (G) ó restricción de comida (*pair-fed*). ANOVA: #: $p < 0,05$; *: $p < 0,01$. Ct y G: $n=6$; G *pair-fed*: $n=4$.

4.3. Efecto de la administración central y aguda de ghrelina

4.3.1. Efecto de la administración central y aguda de ghrelina sobre la ingesta, el peso y los niveles séricos de hormonas metabólicas

El tratamiento central con ghrelina durante 1 hora no modificó la ganancia de peso de estos animales, representada como la diferencia de peso entre el peso anterior y posterior al tratamiento (Ct: $-0,5 \pm 0,8$; G: $-0,9 \pm 0,8$ g). La ingesta de las ratas durante esta hora tampoco se vio modificada (Ct: $1,3 \pm 0,5$; G: $1,0 \pm 0,3$ g).

La glucemia de estos animales, determinada en el momento del sacrificio, no se vio modificada por el tratamiento, al igual que tampoco se modificaron los niveles de insulina o leptina por la administración de ghrelina (Tabla 21). Sin embargo, el tratamiento agudo con ghrelina incrementó significativamente los niveles circulantes de ghrelina total, sin modificar significativamente los niveles ghrelina acilada, disminuyendo el porcentaje de acilación de esta hormona (Tabla 21).

	Control	Ghrelina	p
Glucemia (mg/dl)	97,4 ± 2,5	90,4 ± 4,2	NS
Insulina (ng/ml)	3,2 ± 0,6	2,7 ± 0,4	NS
Leptina (ng/ml)	4,2 ± 0,5	3,6 ± 0,2	NS
Ghrelina total(GT) (pg/ml)	1296,6 ± 115,6	4130,8 ± 785,4*	p < 0,0001
Ghrelina acilada(GA) (pg/ml)	181,0 ± 15,6	238,4 ± 30,1	NS
Ratio GA / GT (%)	14,1 ± 1,0	6,6 ± 2,2 *	p < 0,007

Tabla 21. Variación de los niveles de glucosa en sangre y niveles de insulina, leptina, ghrelina total, ghrelina acilada y porcentaje de acilación de ghrelina en el suero de las ratas tratadas con salino (control) o con ghrelina *icv* y sacrificadas una hora después de la administración. Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (e.e.m.). T-Student: *: significativamente diferente respecto al grupo control; NS= no significativo. Glucemia: realizado a todos los animales del estudio. Hormonas: n=8.

4.3.2. Efecto de la administración central y aguda de ghrelina sobre las proteínas estructurales y sobre los transportadores de glucosa y de glutamato en el hipotálamo

La administración central y aguda de ghrelina no modificó los niveles de GFAP en el hipotálamo (Ct: 100 ± 2,9; G: 101,6 ± 2,6 % control). Tampoco modificó los niveles de GLUT-1 (Ct: 100 ± 8,0; G: 89,8 ± 10,2 % control), pero disminuyó los niveles de GLUT-2 (p<0,001) y GLUT-3 (p<0,05) (Figura 45).

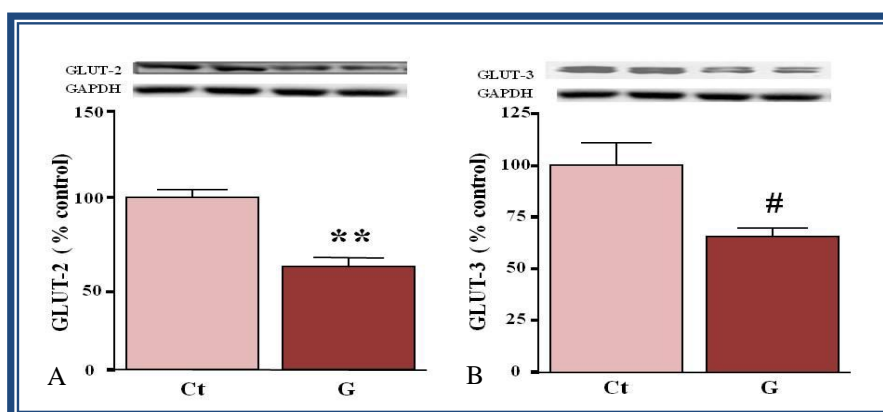


Figura 45. Niveles proteicos relativos de GLUT-2 (A) y GLUT-3 (B) medidos por WB en el hipotálamo de ratas macho tratadas con salino (ct) o con ghrelina (G) *icv* y sacrificadas tras una hora de tratamiento. T-Student #: p < 0,05; **: p < 0,001. n=4.

Los niveles de GLAST y de la isoforma de 55 kDa de GLT-1 incrementaron tras una hora de tratamiento con ghrelina (p<0,05) (Figura 46). La isoforma de 75 kDa de GLT-1 no se vio modificada por la ghrelina (Ct: 100 ± 11,6; G: 108,6 ± 12,7 % control).

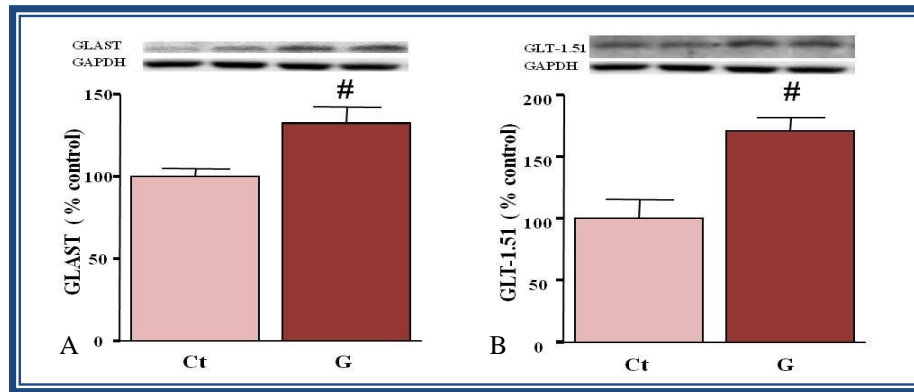


Figura 46. Niveles proteicos relativos de GLAST (A) y GLT-1.51 (B) medidos por WB en el hipotálamo de ratas macho tratadas con salino (ct) o con ghrelina (G) *icv* y sacrificadas tras una hora de tratamiento. T-Student #: $p < 0,05$. $n=4$.

4.4. Efecto de la ghrelina sobre los transportadores de glucosa en la línea neuronal hipotalámica RCA-6

Los niveles de expresión de NPY en esta línea neuronal se encontraban incrementados tras 24 horas de tratamiento con ghrelina (ANOVA 1 vía: $F_{(2,11)}$: 10,572; $p < 0,005$; Ct0: $100 \pm 12,5$; Ct24h: $103,9 \pm 7,7$; G24h: $155,1 \pm 7,2$ % control; $F_{(1,11)}$: 12,057; $p < 0,005$). Igualmente, los niveles de GLUT-1 incrementaron significativamente por efecto de la ghrelina ($F_{(1,6)}$: 15,448; $p < 0,03$). Sin embargo, el tratamiento no modificó los niveles de GLUT-3 (Figura 47). GLUT-2 no fue detectado en estas células.

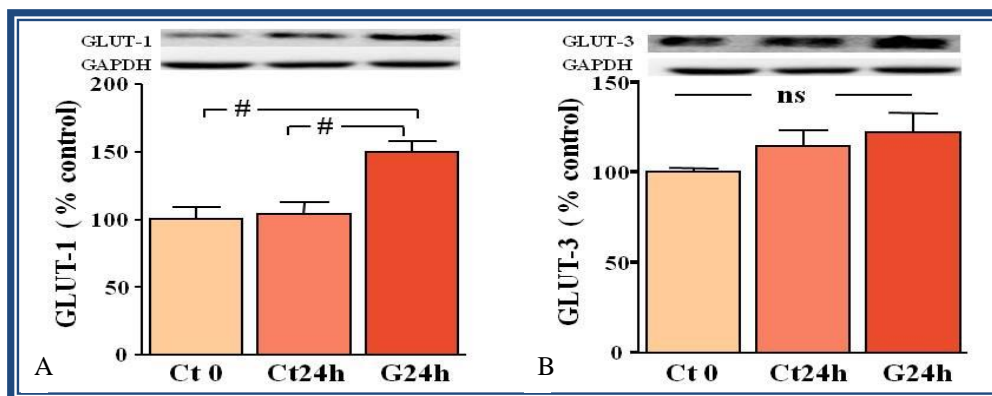


Figura 47. Niveles proteicos relativos de GLUT-1 (A) y GLUT-3 (B) medidos por WB en cultivo neuronal en presencia de ghrelina (50 nM) tras 24 horas de cultivo. Los valores se muestran como media de tres experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los cultivos control (0h). ANOVA: #: $p < 0,05$. ns: no significativo. $n=3$.

4.5. Efecto de la ghrelina sobre los transportadores de glucosa y de glutamato en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos

En los cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos no se detectó el receptor de ghrelina GHS-R1a, ni en condiciones basales ni en respuesta a la ghrelina, por *RT-PCR*.

Los niveles proteicos de GFAP incrementaron tras 24 horas de tratamiento con ghrelina (ANOVA 1 vía: $F_{(2,8)}$: 7,779; $p < 0,01$; Ct0: $100 \pm 6,1$; Ct24h: $94,0 \pm 8,7$; G24h: $149,2 \pm 16,2$ % control; $F_{(1,8)}$: 12,057; $p < 0,005$). Sin embargo, los niveles proteicos de vimentina no se modificaron (Ct0: $100 \pm 0,5$; Ct24h: $115,7 \pm 13,2$; G24h: $122,6 \pm 16,4$ % control).

Los niveles de ARNm de GLUT-1 se vieron afectados por el tiempo de cultivo ($F_{(1,8)}$: 17,047; $p < 0,01$), sin observarse efecto de la ghrelina, ya que los niveles de expresión de este transportador no presentaron diferencias con respecto al control a 24 horas (ANOVA 1 vía: $F_{(2,8)}$: 9,997; $p < 0,05$; Ct0: $100 \pm 0,7$; Ct24h: $161,4 \pm 18,1$; G24h: $152,8 \pm 1,9$ % control). La ghrelina tampoco modificó los niveles de ARNm de GLUT-3 (Ct0: $100 \pm 4,2$; Ct24h: $113,4 \pm 12,4$; G24h: $102,4 \pm 5,4$ % control). Sin embargo, el tiempo incrementó los niveles de ARNm de GLUT-2 (ANOVA 1 vía: $F_{(2,8)}$: 9,192; $p < 0,05$; Ct0: $100 \pm 1,6$; Ct24h: $226,6 \pm 37,7$; G24h: $197,9 \pm 3,9$ % control; $F_{(1,8)}$: 16,720; $p < 0,01$). Mientras que GLUT-1 y GLUT-3 no fueron detectados por *Western blotting*, los niveles proteicos del transportador de glucosa GLUT-2 incrementaron por efecto de la ghrelina ($F_{(1,8)}$: 30,922; $p < 0,002$) (Figura 48).

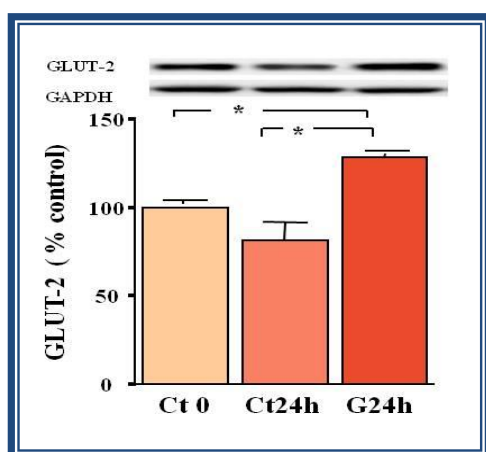


Figura 48. Niveles proteicos relativos de GLUT-2 medidos por WB en cultivo primario de astrocitos hipotalámicos en presencia de ghrelina (100 nM) tras 24 horas de cultivo.

Los valores se muestran como media de tres experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los cultivos control (0h). ANOVA: *: $p < 0,01$. $n=4$.

La ghrelina no modificó los niveles del transportador de glutamato GLT-1 (Figura 49A y 49B). Sin embargo, los niveles proteicos de GLAST incrementaron por efecto de

la ghrelina tras 24 horas de exposición a la misma (Ghrelina: $F_{(1,6)}$: 30,922; $p < 0,002$) (ANOVA 1 vía: $F_{(2,8)}$: 7,276; $p < 0,05$) (Figura 49C).

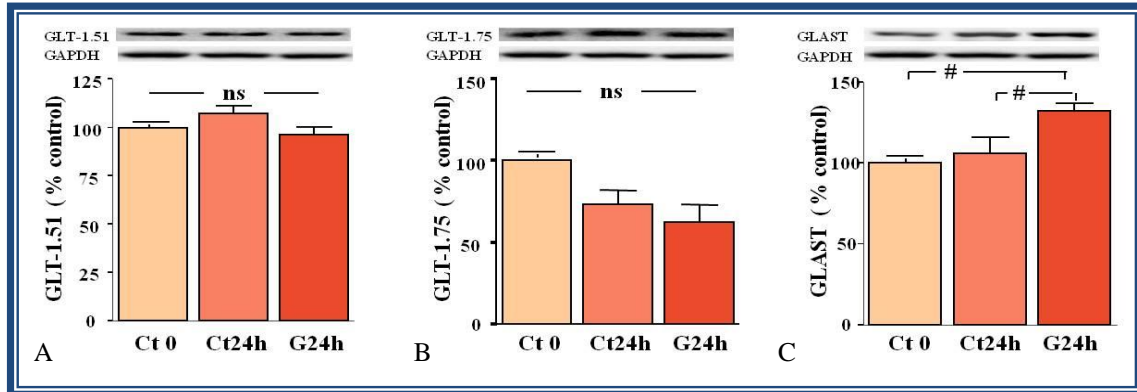


Figura 49. Niveles proteicos relativos de GLT-1 (A,B) y GLAST (C) medidos por WB en cultivo primario de astrocitos hipotalámicos en presencia de ghrelina (100 nM) tras 24 horas de cultivo. Los valores se muestran como media de tres experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los cultivos control (0h). ANOVA: #: $p < 0,05$. ns: no significativo. $n=4$.

Tanto los niveles como la localización de GLUT-2 y de GLAST en los astrocitos hipotalámicos se vieron afectados por el tratamiento con ghrelina, tal y como se observó en las inmunocitofluorescencias realizadas (Figura 50).

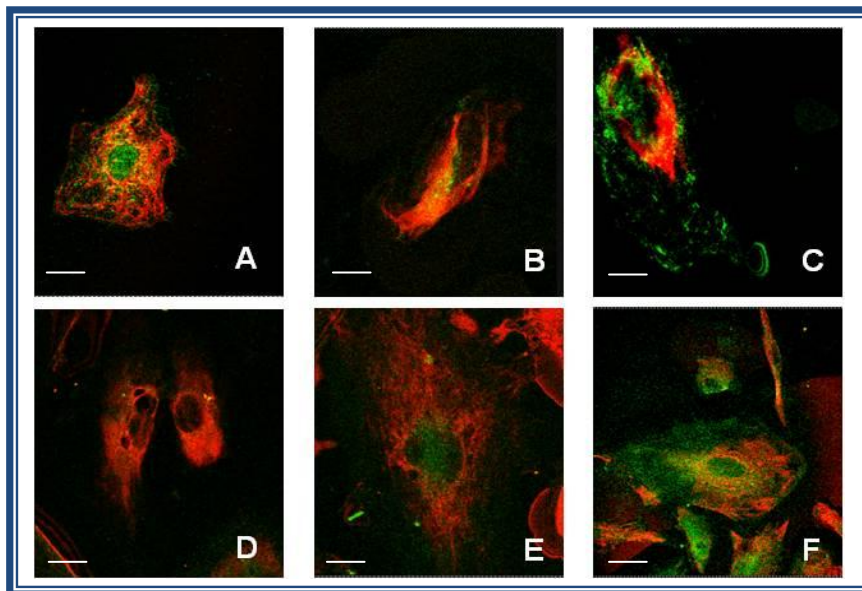


Figura 50. Microfotografías representativas de doble inmunocitoquímica para la proteína vimentina en rojo (♦) y los transportadores GLUT-2 (fila superior) o GLAST (fila inferior), marcadas en verde (◆) en cultivo primario de astrocitos hipotalámicos. A y D: cultivos control tiempo 0; B y E: cultivos control tiempo 24h; C y F: cultivos con ghrelina (100 nM) 24h. Escala (fotografías A-F): 10 μ m.

4.6. Efecto de la ghrelina sobre el transportador de glucosa GLUT-2 y el transportador de glutamato GLAST en la línea celular de astrocitoma C6

Tras observar que la ghrelina incrementaba los niveles totales de GFAP en estas células ($F_{(2,5)}$: 13,342; $p < 0,04$; Ct0: $100 \pm 8,8$; Ct24h: $102,4 \pm 7,8$; G24h: $146,7 \pm 4,1$ % control) y que no modificaba los niveles de vimentina (Ct0: $100 \pm 5,1$; Ct24h: $107,9 \pm 12,6$; G24h: $94,7 \pm 10,6$ % control), se determinó el efecto de la ghrelina sobre los niveles totales de GLUT-2 y GLAST en estas células. Además, se investigó si la localización celular de estos transportadores se vio modificada por el tratamiento, analizando los niveles de ambos transportadores en la membrana plasmática. Este estudio no se pudo realizar en cultivos primarios debido a la gran cantidad de células requeridas para el mismo.

La ghrelina incrementó los niveles proteicos totales de GLUT-2 ($F_{(2,5)}$: 31,475; $p < 0,0001$) y GLAST ($F_{(2,5)}$: 10,977; $p < 0,05$) en estas células. Los niveles de estos transportadores en la membrana plasmática también se encontraban incrementados por efecto de la ghrelina (GLUT-2: $F_{(2,5)}$: 14,269; $p < 0,03$; GLAST: $F_{(2,5)}$: 198,372; $p < 0,002$). GAPDH no se detectó en la fracción membrana (Figura 51).

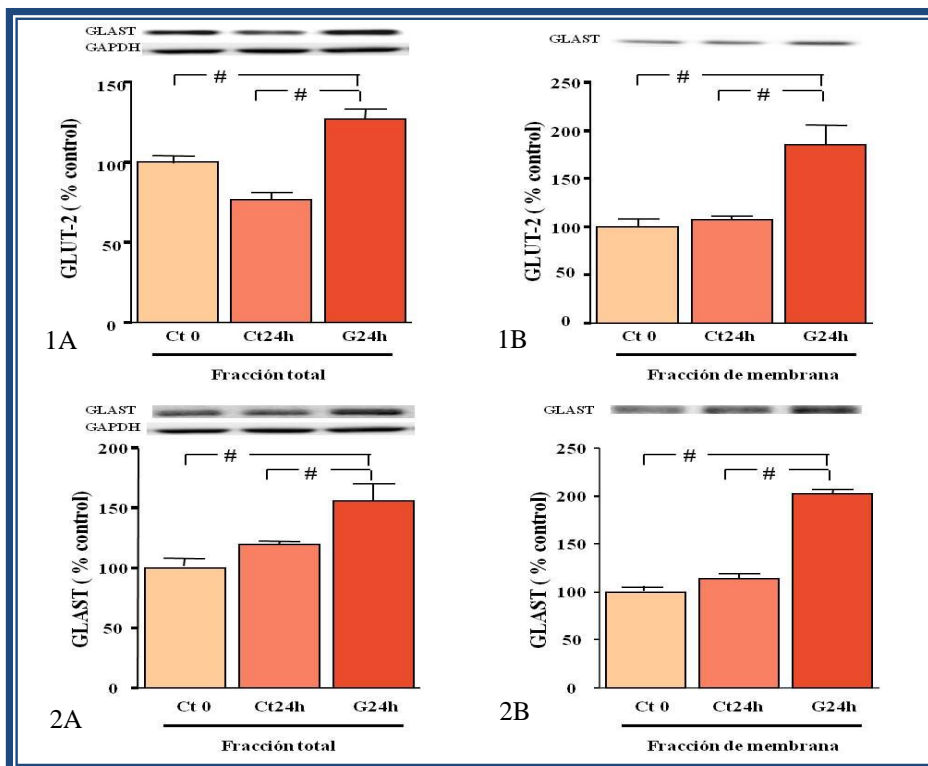


Figura 51. Niveles proteicos de GLUT-2 (1) y GLAST (2), fracción total (A) y de membrana (B), medidos por WB en cultivo de astrocitoma en presencia de ghrelina (100 nM) tras 24 horas de cultivo. Los valores se muestran como media de dos experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los cultivos control (0h). ANOVA: #: $p < 0,05$.

4.7. Efecto de la administración central y crónica de leptina

4.7.1 Efecto de la administración central y crónica de leptina sobre el peso corporal y los niveles séricos de hormonas metabólicas

Las ratas tratadas con leptina presentaron una disminución del peso corporal durante los 14 días que duró el tratamiento (Ct: $16,7 \pm 3,7$; leptina: $2,2 \pm 5,7$ g; $p < 0,05$). Las ratas tratadas con leptina tendían a presentar niveles circulantes de leptina mayores que los controles, pero esta diferencia no alcanzó la significación estadística (Tabla 22). El tratamiento con leptina tampoco indujo alteraciones significativas en los niveles circulantes de glucosa, insulina o ghrelina (total, acilada y ratio GA/GT) (Tabla 22).

Los niveles circulantes de leptina no correlacionaron ni con el cambio de peso ni con los niveles circulantes de ghrelina (total, acilada ni con el porcentaje de acilación). Sin embargo, hubo una correlación negativa entre la ganancia de peso y los niveles de ghrelina acilada ($R = 0,893$, $p < 0,001$) y el porcentaje de acilación ($R = 0,859$, $p < 0,0001$), pero no con los niveles de ghrelina total ($R = 0,056$, $p > 0,05$).

	Control	Leptina	T-Student
Glucemia (mg/dl)	$92,9 \pm 2,4$	$93,0 \pm 1,2$	NS
Insulina (ng/ml)	$1,03 \pm 0,29$	$0,89 \pm 0,45$	NS
Leptina (ng/ml)	$4,34 \pm 1,06$	$7,47 \pm 4,57$	NS
Ghrelina total (GT) (pg/ml)	$1593,5 \pm 263,7$	$1642,3 \pm 240,8$	NS
Ghrelina acilada (GA) (pg/ml)	$285,8 \pm 41,4$	$346,9 \pm 96,6$	NS
Ratio GA / GT (%)	$16,2 \pm 1,5$	$20,7 \pm 8,4$	NS

Tabla 22. Niveles de glucosa en sangre y niveles de insulina, leptina, ghrelina total, ghrelina acilada y porcentaje de acilación de ghrelina en el suero de ratas tratadas durante 14 días con salino (control) o leptina *icv*. Los valores se muestran como media \pm error estándar de la media (e.e.m). NS: no significativo. n=6.

4.7.2. Efecto de la administración central y crónica de leptina sobre las proteínas estructurales y sobre los transportadores de glucosa y de glutamato en el hipotálamo

La administración de leptina (L) incrementó los niveles de GFAP (Ct: $100 \pm 7,1$; L: $132,4 \pm 7,0$ % control; $p < 0,05$) y de vimentina (Ct0: $100 \pm 5,9$; L: $287,0 \pm 66,7$ % control; $p < 0,02$) y disminuyó los niveles de β -actina (Ct: $100 \pm 3,6$; L: $64,1 \pm 8,1$ %

control; $p < 0,01$) y PCNA (Ct0: $100 \pm 5,5$; L: $65,2 \pm 3,8$ % control; $p < 0,001$) en el hipotálamo.

El tratamiento con leptina resultó en una disminución significativa de los niveles proteicos de GLUT-3 en el hipotálamo (Figura 52A; $p < 0,02$), sin ejercer ningún efecto sobre GLUT-1 (Ct: $100 \pm 12,2$; L: $87,6 \pm 12,8$ % control) ni GLUT-2 (Ct: $100 \pm 11,6$; L: $74,5 \pm 4,5$ % control). La administración central de leptina tampoco modificó los niveles del transportador de glutamato GLT-1 (GLT-1.75: Ct: $100 \pm 6,6$; L: $108,7 \pm 6,7$ % control; GLT-1.51: Ct: $100 \pm 2,5$; L: $94,6 \pm 3,6$ % control), pero indujo una disminución significativa en los niveles de GLAST con respecto a los controles (Figura 52B; $p < 0,0001$).

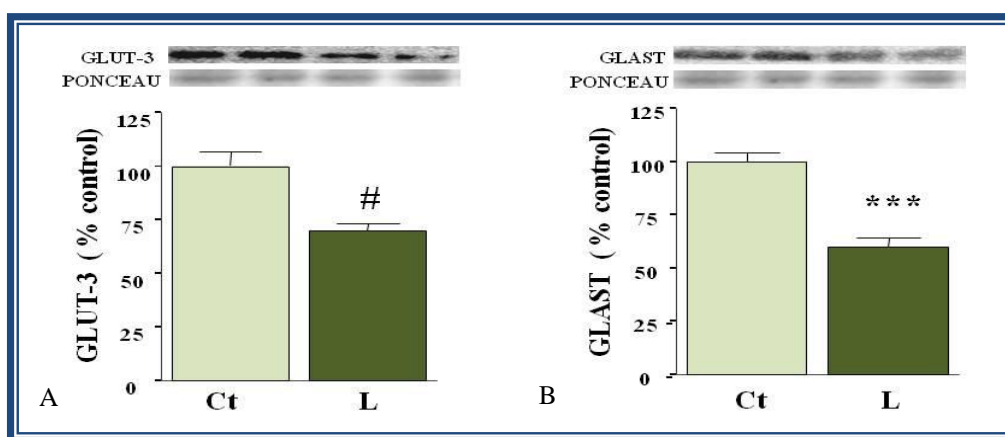


Figura 52. Niveles proteicos relativos de GLUT-3 (A) y GLAST (B) medidos por WB en el hipotálamo de ratas macho tratadas durante 14 días con salino (ct) o leptina (L) *icv*. T-Student: #: $p < 0,05$; ***: $p < 0,0001$. $n=6$.

4.8. Efecto de la leptina sobre los transportadores de glucosa en la línea neuronal hipotalámica RCA-6

Los niveles de expresión de NPY en esta línea neuronal se encontraban incrementados tras 24 horas de tratamiento con leptina (ANOVA 1 vía: $F_{(2,11)}: 33,056$; $p < 0,0001$; Ct0: $100 \pm 16,3$; Ct24h: $107,5 \pm 4,0$; L24h: $202,9 \pm 10,1$ % control; $F_{(1,11)}: 48,399$; $p < 0,0001$). El tratamiento no tuvo efecto sobre los niveles del transportador GLUT-1 en esta línea neuronal (Ct0: $100 \pm 5,2$; Ct24h: $131,0 \pm 15,3$, L24h: $162,3 \pm 24,1$). Sin embargo, la leptina disminuyó los niveles del transportador de glucosa GLUT-3 tras 24 horas de exposición al tratamiento, con respecto a los controles a tiempo 0 ($F_{(1,6)}: 5,768$; $p < 0,04$) (Figura 53).

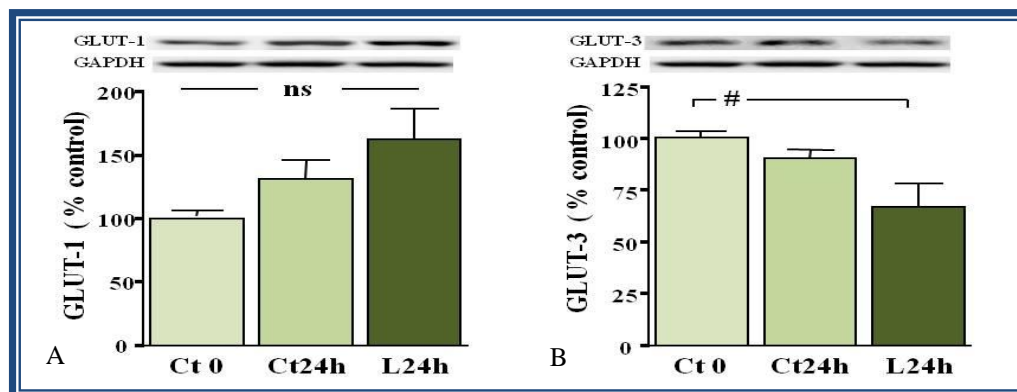


Figura 53. Niveles proteicos relativos de GLUT-1 y GLUT-3 medidos por WB en cultivo neuronal en presencia de leptina (10 ng/ml) tras 24 horas de cultivo. Los valores se muestran como media de tres experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los cultivos control (0h). ANOVA: GLUT-3: #: $p < 0,05$. ns: no significativo. $n=3$.

4.9. Efecto de la leptina sobre los transportadores de glucosa y de glutamato en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos

Tras 24 horas de tratamiento con leptina (100 ng/ml) los niveles de ARNm del receptor de leptina y de GFAP incrementaron significativamente en los astrocitos primarios hipotalámicos (ObR: $F_{(2,8)}$: 4,282; $p < 0,05$; Ct24h: $100 \pm 5,5$; L24h: $138,3 \pm 14,9$ % control; GFAP: $F_{(2,8)}$: 7,673; $p < 0,01$; Ct0: $100 \pm 4,9$; Ct24h: $50,7 \pm 8,7$; L24h: $148,3 \pm 7,2$; $F_{(1,8)}$: 10,158; $p < 0,01$). Los niveles proteicos de vimentina no se modificaron (Ct0: $100 \pm 12,2$; Ct24h: $60,1 \pm 23,7$; L24h: $95,7 \pm 34,2$).

Los niveles de ARNm de GLUT-1 no se vieron afectados por el tratamiento, pues los niveles de expresión de este transportador no presentaron diferencias con respecto al control a 24 horas (Ct0: $100 \pm 3,5$; Ct24h: $153,9 \pm 11,5$; L24h: $139,3 \pm 9,7$ % control). La leptina no modificó los niveles de expresión de GLUT-2 (Ct0: $100 \pm 6,9$; Ct24h: $161,6 \pm 53,0$; L24h: $110,7 \pm 28,4$ % control) o GLUT-3 (Ct0: $100 \pm 2,6$; Ct24h: $105,5 \pm 4,5$; L24h: $100,9 \pm 14,8$ % control). Los niveles proteicos de GLUT-2 tampoco estuvieron afectados por el tratamiento (Ct0: $100 \pm 4,2$; Ct24h: $101,4 \pm 6,6$; L24h: $95,3 \pm 10,6$ % control). Los niveles proteicos de las dos isoformas del transportador de glutamato GLT-1 disminuyeron por el tratamiento con leptina (GLT-1.75: $F_{(1,15)}$: 6,037; $p < 0,03$; GLT-1.51: $F_{(1,15)}$: 29,518; $p < 0,0001$), pues tras 24 horas de tratamiento los niveles de GLT-1 estaban reducidos respecto al control a tiempo 0 y a 24 horas (Figura 54A y 54B). La leptina también disminuyó los niveles de GLAST respecto al nivel de los controles a tiempo 0 y 24 horas ($F_{(1,15)}$: 6,998; $p < 0,03$) (Figura 54C).

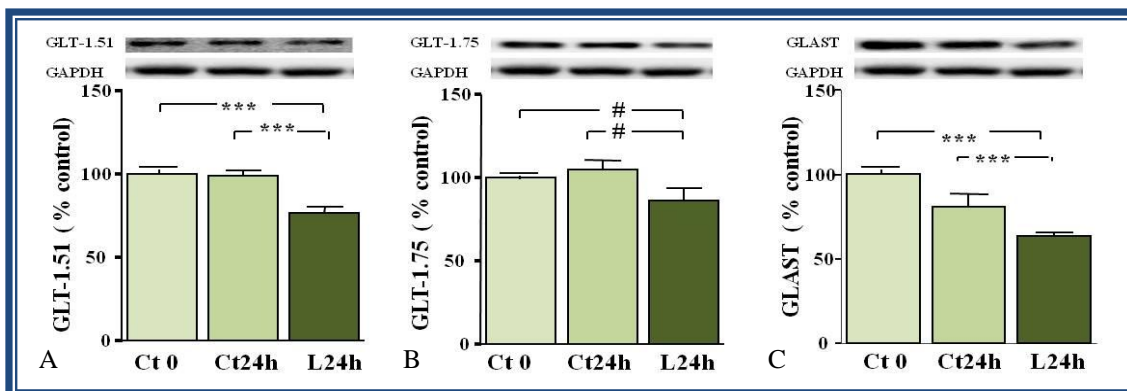


Figura 54. Niveles proteicos relativos de GLT-1 (A,B) y GLAST (C) medidos por WB en cultivo primario de astrocitos hipotalámicos en presencia de leptina (100 ng/ml) tras 24 horas de cultivo. Los valores se muestran como media de tres experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los cultivos control (0h). ANOVA: #: $p < 0,05$; ***: $p < 0,0001$. $n=3$.

Tanto los niveles como la localización de GLUT-2 y de GLAST en los astrocitos hipotalámicos se vieron afectados por el tratamiento con leptina, tal y como se observó en las inmunocitofluorescencias realizadas (Figura 55).

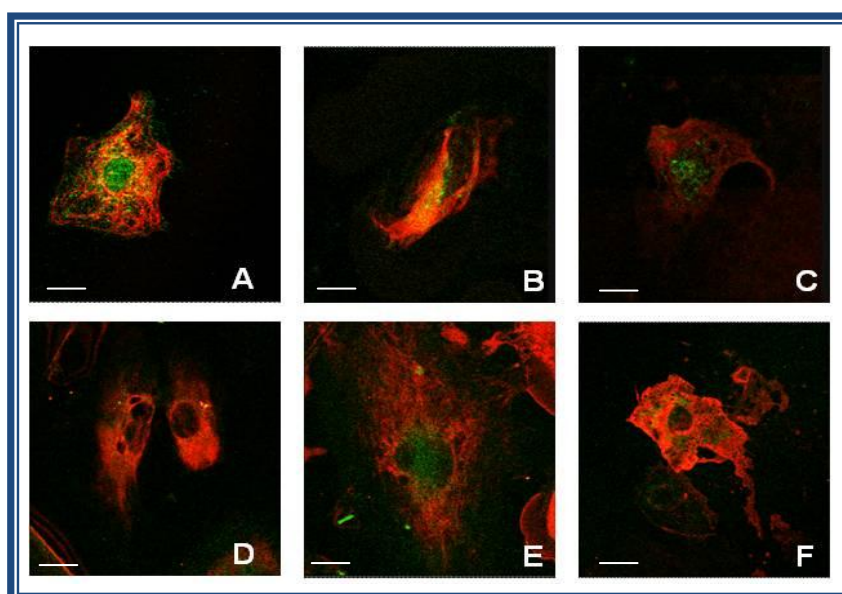


Figura 55. Microfotografías representativas de doble inmunocitoquímica para la proteína vimentina en rojo (♦) y los transportadores GLUT-2 (fila superior) o GLAST (fila inferior), marcadas en verde (◆) en cultivo primario de astrocitos hipotalámicos. A y D: cultivos control tiempo 0; B y E: cultivos control tiempo 24h; C y F: cultivos con leptina (100 ng/ml) 24h. Escala (fotografías A-F): 10 μm .

4.10. Determinación de los niveles de glutamato liberado al medio en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos

Se midieron los niveles de glutamato en el medio de cultivo de los astrocitos tratados 24 horas con leptina o con ghrelina. La ghrelina disminuyó y la leptina incrementó los niveles de glutamato en el medio (Figura 56).

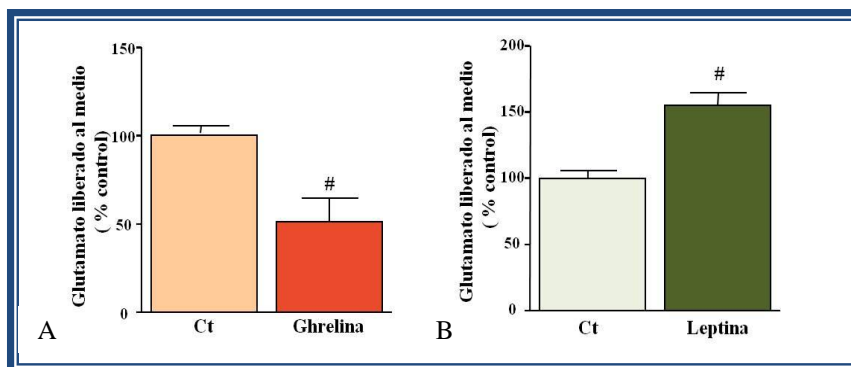


Figura 56. Niveles de glutamato detectados en el medio de cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos en presencia de ghrelina (100 nM) (A) o de leptina (100 ng/ml) (B) tras 24 horas de cultivo. T-Student: #: $p < 0,05$. $n = 4$.

4.11. Efecto de la leptina sobre el transportador de glucosa GLUT-2 y el transportador de glutamato GLAST en la línea celular de astrocitoma C6

La leptina incrementó los niveles de GFAP en estas células ($F_{(2,5)}$: 10,623; $p < 0,05$; Ct0: $100 \pm 8,8$; Ct24h: $102,4 \pm 7,8$; L24h: $141,0 \pm 3,4$ % control), mientras que los niveles de vimentina no se modificaron con el tratamiento (Ct0: $100 \pm 5,1$; Ct24h: $107,9 \pm 12,6$; L24h: $99,1 \pm 9,8$ % control). El tratamiento con leptina tampoco modificó los niveles proteicos totales de GLUT-2 (Ct0: $100 \pm 0,3$; Ct24h: $107,2 \pm 4,2$; L24h: $95,4 \pm 23,4$ %) ni los niveles proteicos de este transportador en la membrana (Ct0: $100 \pm 8,8$; Ct24h: $102,4 \pm 7,8$; L24h: $141,0 \pm 3,4$ % control). Los niveles proteicos totales de GLAST disminuyeron tras 24 horas de cultivo con leptina ($F_{(2,5)}$: 23,839; $p < 0,05$), encontrándose igualmente disminuídos los niveles de este transportador en la membrana plasmática ($F_{(2,5)}$: 15,844; $p < 0,05$). (Figura 57).

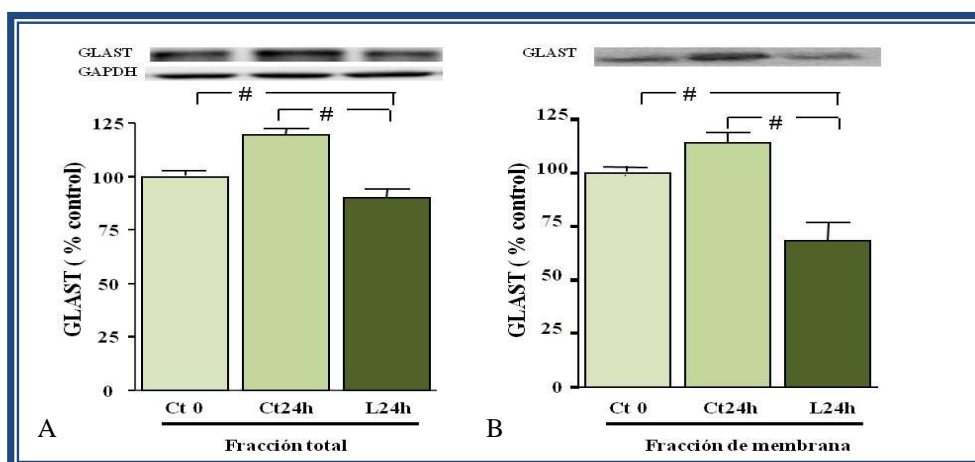


Figura 57. Niveles proteicos totales (A) y de membrana (B) de GLAST, medidos por *Western blotting* en cultivo de astrocitoma en presencia de leptina (100 ng/ml) tras 24 horas de cultivo. Los valores se muestran como media de dos experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los cultivos control (0h). ANOVA: #: $p < 0,05$. ns: no significativo.

VI. DISCUSIÓN

La incidencia de la obesidad ha incrementado de manera alarmante en la población de los países desarrollados en los últimos años, motivo por el cual se ha convertido en una de las áreas más activas en la investigación biomédica. Se sabe que son muchos los factores que condicionan la ganancia de peso corporal. En efecto, no solo los factores genéticos y hormonales afectan al desarrollo de obesidad; el entorno neonatal, el sexo y las condiciones nutricionales en etapas tempranas de la vida son factores que condicionan el incremento de peso. Además, los resultados obtenidos indican que no solo es la cantidad de calorías consumidas sino el tipo de alimento ingerido lo que condicionará el fenotipo.

Aunque se ha avanzado considerablemente en el estudio del papel de las neuronas hipotalámicas en el control del metabolismo, sólo recientemente se ha prestado atención a la participación de la glía en la ganancia de peso. Desde hace algún tiempo se conoce que los astrocitos participan en el transporte y detección de glucosa; sin embargo, se desconoce cómo esto afecta a la respuesta neuronal sobre la ingesta de alimentos.

Utilizando un modelo relativamente fisiológico, en el que se inducen cambios en la ingesta neonatal, hemos observado que ambos sexos responden de forma diferente en su ganancia de peso, tanto cuando siguen una dieta normal como en respuesta a una dieta alta en carbohidratos. Al centrarnos en el estudio de los cambios metabólicos en los machos, detectamos que dichos cambios se asocian con modificaciones en proteínas estructurales de la glía, en el número de astrocitos y en los transportadores de glucosa y de glutamato en el hipotálamo. Algunos de estos cambios pueden deberse a los efectos directos de la leptina o de la ghrelina, como describiremos a continuación.

Dimorfismo sexual en la respuesta metabólica a la malnutrición neonatal así como a la introducción de una dieta rica en sacarosa en la etapa adulta.

Las condiciones nutricionales tempranas generan modificaciones a largo plazo en el peso de los animales

- *Sobrenutrición neonatal*

El incremento de peso corporal debido al incremento de la ingesta durante la lactancia, consecuencia de una reducción en el tamaño de la camada, ha sido descrito previamente (Plagemann y cols., 1999a; Boullu-Ciocca y cols., 2005; Glavas y cols., 2010). Los datos obtenidos no sólo confirman los reportes previos sino que extienden dichos resultados a ambos sexos. Además, nuestros resultados ponen de manifiesto que la ganancia de peso no se encuentra afectada de la misma manera en las diferentes edades o periodos postnatales. En machos y hembras, la sobrenutrición neonatal genera una mayor ganancia de peso hasta el momento del destete. Sin embargo, las diferencias detectadas en la ganancia de peso con respecto al grupo control se pierden durante la pubertad, a pesar de mantenerse las diferencias en el peso corporal. Posteriormente, entre los días posnatal 50 y 65, la diferencia en la ganancia de peso entre las ratas sobrenutridas neonatalmente y las ratas control vuelve a hacerse significativa. Dado que la ingesta no se encontraba alterada en este momento, esta diferencia en el aumento de peso después de la pubertad podría deberse a un cambio en la eficiencia metabólica.

Las condiciones nutricionales durante las primeras etapas del desarrollo pueden generar efectos a largo plazo en el crecimiento y desarrollo, así como en la respuesta a cambios metabólicos en la edad adulta. Estudios previos en animales sugieren que cualquier estímulo producido durante el desarrollo genera una respuesta fisiológica permanente (Lucas, 1998). Nuestros datos indican que las condiciones nutricionales tempranas son críticas, pues producen efectos sobre el organismo que persisten en etapas posteriores de la vida, tal y como se ha descrito previamente (Lucas; 1998; Boullu-Ciocca y cols., 2005). Dado que es en estos períodos tempranos de la vida donde se produce la diferenciación neuronal y la maduración del sistema nervioso central (SNC),

la nutrición prenatal y neonatal ejercen una influencia crítica en el desarrollo y regulación de vías involucradas en el crecimiento (Mendieta-Zerón y cols., 2007).

Previamente se han descrito algunos efectos del desarrollo sobre el aumento de peso, los cuales se producen, o se hacen más evidentes, durante la edad adulta o en el momento en el que se presenta un estrés o un cambio metabólico (Vickers y cols., 2005; Saenger y cols., 2007; Glavas y cols., 2010). Por lo tanto, para determinar el efecto de la nutrición neonatal sobre el metabolismo en el adulto ha de tomarse en consideración el incremento de peso absoluto en los diferentes períodos de desarrollo.

Con la edad un animal tiende a incrementar la ganancia de peso corporal, incrementando sus depósitos de grasa (Han y cols., 2011), a pesar de no incrementar su ingesta, lo que se debe a una disminución del gasto energético (Han y cols., 2011). Podría ser que estos animales con sobrenutrición neonatal presenten este efecto acentuado.

La sobrenutrición neonatal *per se* o el consecuente incremento de peso produce otra serie de modificaciones cardiovasculares, metabólicas y renales detectadas en ratas viejas, tales como hipertensión, elevación de los niveles de tejido adiposo, hiperleptinemia, hiperinsulinemia y una sobrerregulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (Plagemann y cols., 1999b; Boullu-Ciocca y cols., 2005; Plagemann 2006a y 2006b; Boubred y cols., 2009), alteraciones que ponen de manifiesto la importancia de la nutrición durante las primeras etapas de la vida.

- ***Malnutrición neonatal***

A diferencia del efecto producido por la sobrenutrición neonatal, observamos que la restricción de la ingesta, o malnutrición, en etapas tempranas del desarrollo postnatal tiene efectos sexuales dimórficos sobre la ganancia de peso a largo plazo y sobre la ingesta. Un incremento del tamaño de la camada durante la lactancia disminuye la disponibilidad de nutrientes en este periodo y genera la reducción del peso corporal en ambos sexos. Sin embargo, mientras que las hembras malnutridas postnatalmente normalizaron sus pesos corporales a día postnatal 65, los machos malnutridos neonatalmente tuvieron una ingesta menor y continuaron ganando menos peso que las ratas control durante todo el estudio.

El crecimiento recuperador o *catch-up* es un fenómeno fisiológico clave para los individuos con retraso del crecimiento intrauterino o para aquellos que han sufrido una desnutrición temprana (Argente y cols., 2007; Saenger y cols., 2007; Chen y cols., 2009), para

alcanzar una altura y peso normales (Karlberg y Albertsson-Wikland, 1995). En general, el *catch-up* se define como una velocidad de crecimiento, en particular de aumento de peso o longitud, por encima de los límites estadísticos normales para la edad cronológica y sexo, y se produce tras un periodo de inhibición del crecimiento a consecuencia de un insulto o condición que lo suprime (Wilson y Osbourn, 1960; Prader y cols., 1963; Tanner, 1986; Saenger y cols., 2007). Una vez alcanzado el tamaño adecuado, el crecimiento se ralentiza hacia velocidades de mantenimiento (Tanner, 1986). El *catch-up* se produce en diferentes especies y es generado en respuesta a multitud de impedimentos de crecimiento diferentes (Boersma y Wit, 1997; Emons y cols., 2005; Even-Zohar y cols., 2008; Chen, Hu y cols., 2011). Sin embargo, la eliminación del factor que impide el crecimiento normal no siempre genera o concluye en un *catch-up* (Houdijk y cols., 2003; Oreffo y cols., 2003; Crowther y cols., 2008).

Machos y hembras pueden responder con diferentes patrones de crecimiento cuando son sometidos al mismo estrés o al mismo factor que impide el crecimiento (Sant'Anna y Mortola, 2003; García-Cáceres y cols., 2010). En estudios previos en ratas se ha observado que la desnutrición durante el período de lactancia va seguida de un *catch-up* en ambos sexos (Williams y cols., 1974a y 1974b); sin embargo, mientras que en las hembras el *catch-up* fue completo, hasta alcanzar un peso y tamaño corporal normales (Williams y cols., 1974b), en los machos no se llegaron a alcanzar los valores de normalidad (Williams y cols., 1974a), atribuyéndose el déficit de peso a un déficit de tejidos blandos (Williams y cols., 1974a). En un trabajo previo (Remmers y Fodor, 2008) se observó que la restricción de la ingesta durante la vida postnatal temprana generaba un *catch-up* posterior al destete. Sin embargo, los animales permanecieron con menor talla y peso que los animales del grupo control, resultado que apoya lo observado en nuestro estudio, en el cual los machos malnutridos seguían pesando menos que los controles a lo largo de todo el experimento. Del mismo modo, se ha publicado que las niñas recién nacidas pequeñas para su edad gestacional también normalizan su índice de masa corporal más rápidamente que los niños (Gohlke y cols., 2009), lo que sugiere que los varones pueden ser más susceptibles a los efectos a largo plazo de la malnutrición temprana sobre la ganancia de peso. Dado que el peso corporal influye en la capacidad reproductiva en las mujeres (Davies, 2006), podría ser que este sexo haya desarrollado un mecanismo de defensa específico con el fin de mantener la capacidad reproductiva.

Por otra parte, una rápida recuperación del crecimiento y del aumento de peso infantil desvía la energía de manera desproporcionada al tejido adiposo, especialmente al abdomen, lo que aumenta la carga metabólica. Estos procesos complementarios pueden representar un mayor riesgo de enfermedades en los nacidos con bajo peso que presentan una mayor tasa de crecimiento postnatal (Wells y cols. 2007).

Estos datos ponen de manifiesto la importancia de las condiciones nutricionales durante los periodos tempranos del desarrollo, las cuales desempeñan una función relevante en la etiología de la obesidad, pues pueden predisponer al individuo al desarrollo de esta enfermedad y del síndrome metabólico en la etapa adulta (McMillen y Robinson 2005; Plagemann, 2006a y 2006b; Argente, 2011; Martos-Moreno y Argente, 2011). Tanto en humanos como en animales hay datos claros que sugieren que las trayectorias de crecimiento durante etapas tempranas de la vida pueden influir sobre el metabolismo del adulto y pueden, igualmente, ser buenos predictores del riesgo de padecer enfermedades crónicas posteriores (Jimenez-Chillaron y Patti, 2007; Lucas, 2010).

El efecto de una dieta rica en sacarosa en la etapa adulta sobre el peso depende de las condiciones nutricionales tempranas

Durante las dos semanas de dieta rica en sacarosa en animales adultos, las ratas que siguieron la misma disminuyeron su ingesta de pienso, tanto los machos como las hembras, y con independencia del tamaño de la camada durante la lactancia, tal y como se ha descrito previamente (Raben y cols., 2002; Lindqvist y cols., 2008; Alzamendi y cols., 2010; Sheludiakova y cols., 2011). Sin embargo, la ingesta de sacarosa incrementó el consumo energético (Oliva y cols., 2011; Sheludiakova y cols., 2011). Las ratas de ambos sexos sobrenutridas neonatalmente y con una dieta rica en sacarosa presentaron un mayor consumo energético que las malnutridas que siguieron la misma dieta. Sin embargo, mientras que en los machos malnutridos neonatalmente el consumo de Kcal no era diferente de los controles, en las hembras, se redujo significativamente.

Se ha descrito que la nutrición materna modula las preferencias alimenticias de los hijos (Bellinger y cols., 2004) y que el comportamiento alimenticio hedónico, en busca del placer, está afectado por distintos factores como el sexo y el estado de las hormonas

sexuales (Sclafani y cols., 1987; Jezová y cols., 2002; Yanovski, 2003), teniendo las hembras una mayor preferencia por los alimentos dulces (Sclafani y cols., 1987; Jezová y cols., 2002; Yanovski, 2003; Michaels y Holtzman, 2007). De acuerdo con estudios previos, aunque las hembras consumen menos Kcal totales (procedentes del pienso y de la bebida) que los machos procedentes de camadas del mismo tamaño, tienden a ingerir un mayor porcentaje de Kcal en forma de sacarosa.

A pesar del incremento en la cantidad total de Kcal ingeridas, producido por el consumo de sacarosa, no existió un aumento en la ganancia de peso. Las ratas que siguieron la dieta rica en sacarosa presentaron un incremento de peso similar o incluso menor que sus controles, hecho detectado en ambos sexos. En las ratas procedentes de camadas de tamaño normal, la ingesta de sacarosa no afectó la ganancia de peso, lo que confirma los datos descritos previamente en estudios en los que ratas macho consumían sacarosa durante 3 semanas o un mes (Sclafani y cols., 1987, Soria y cols., 2001; Yanovski, 2003; Michaels y Holtzman, 2007; Avena y cols., 2008; Gibson, 2008; Chun y cols., 2010; Sheludiakova y cols., 2011), indicando que las ratas regulan su ingesta calórica mediante la disminución del consumo de pienso, compensando así el incremento de Kcal consumidas a través de la sacarosa y resultando en un peso corporal normal. La diversidad de resultados obtenidos previamente al respecto, indicando que una dieta rica en carbohidratos aumenta (Ludwig y cols., 2001; Raben y cols., 2002; Alzamendi y cols., 2010; Couvreur y cols., 2011), o disminuye (Hill y Lewis y cols., 1992; Prentice, 1995; Gibson, 1996; Cambri y cols., 2010) el peso corporal, podrían deberse a diferencias de especies, sexo, tipo de hidratos de carbono empleados, el momento en que se introdujo la dieta o el periodo de tiempo en el cual el animal estuvo expuesto a dicha dieta.

Por el contrario, las ratas que consumieron sacarosa y que procedían de las camadas de pequeño tamaño ganaron menos peso que sus controles, alimentadas con dieta normal, durante estas dos semanas de dieta. Esta disminución en la ganancia de peso, no detectada en las ratas procedentes de camadas de tamaño normal, puede ser debida a que las ratas sobrenutridas neonatalmente presenten un mayor consumo de sacarosa, lo que afectaría a la ganancia de peso.

Es interesante observar que las hembras malnutridas neonatalmente tuvieron una reducción significativa en la ganancia de peso con el consumo de sacarosa, mientras que los machos malnutridos no presentan esa reducción en el peso tras la dieta. Como se ha

visto que el *catch-up* aumenta la posibilidad de desequilibrios metabólicos posteriores (Saenger y cols., 2007), la recuperación del crecimiento que presentaron las hembras malnutridas durante la lactancia podría haber aumentado su susceptibilidad a este posterior reto metabólico.

Los efectos diferenciales de la sacarosa en el aumento de peso no se pueden explicar por la cantidad de Kcal totales ingeridas o por el porcentaje de Kcal de sacarosa en los diferentes grupos experimentales. Es posible que la ingesta neonatal (tanto la sobrenutrición como la malnutrición) induzca cambios metabólicos que afecten al metabolismo de los hidratos de carbono. Cabe destacar la disminución del consumo de pienso por parte del grupo que siguió la dieta rica en sacarosa. La reducción de la ingesta de pienso produce, a su vez, una disminución del aporte de proteínas, micronutrientes, fibras y ácidos grasos esenciales (Sheludiakova y cols., 2011), lo que podría generar no sólo cambios en el peso corporal sino también alteraciones metabólicas importantes.

Una dieta rica en sacarosa incrementa los niveles circulantes de leptina

En el momento del sacrificio los niveles de las hormonas metabólicas analizadas no se vieron afectados por el tamaño de camada durante la lactancia, en ratas alimentadas con una dieta normal. Tampoco se detectó ningún efecto de la sacarosa en los niveles de insulina o de ghrelina total y acilada. Ha de tenerse en cuenta que en estos experimentos los animales no estuvieron en condiciones de ayuno durante las horas previas al sacrificio para conservar la influencia del consumo de sacarosa. Este hecho podría ser responsable de la variabilidad detectada en los niveles de hormonas circulantes. Del mismo modo, al tratarse de adultos jóvenes, es posible que aún no se hayan generado todos los cambios metabólicos y por ello no se hayan detectado diferencias entre los grupos.

La ingesta de sacarosa durante dos semanas en la etapa adulta tuvo un efecto generalizado sobre los niveles de glucosa, aumentando la glucemia en todos los grupos. Las hembras presentaron niveles de insulina significativamente menores que los detectados en los machos. Se ha descrito que machos y hembras presentan diferente sensibilidad a la insulina, lo que podría influir en las diferentes respuestas a la ingesta de carbohidratos y al desarrollo de diabetes (Vital y cols., 2006; Gómez-Pérez y cols., 2008).

Los niveles circulantes de leptina estaban incrementados en las ratas que consumieron sacarosa. Ya que el consumo de sacarosa se asocia con el aumento de la ingesta calórica es probable que la sacarosa haya inducido una acumulación de grasa en estos animales, tal y como sugiere el aumento de los niveles circulantes de leptina, tal y como se ha descrito anteriormente (Kim y cols., 1999; Rajkumar y cols., 1999; Soria y cols., 2001), y como hemos podido comprobar posteriormente. El hecho de que el aumento de grasa no se refleje en el peso corporal podría deberse a la disminución del consumo de pienso, que reduce el aporte de proteínas y que podría generar un menor crecimiento longitudinal.

Con los resultados obtenidos en este estudio podemos determinar que, ante cambios en la nutrición neonatal, machos y hembras presentan diferentes respuestas a largo plazo, siendo las hembras menos susceptibles que los machos a los efectos de la malnutrición neonatal. A pesar de que la respuesta de ganancia de peso debida a la ingesta de sacarosa durante dos semanas en la etapa adulta fue similar en machos y hembras, ésta se vio afectada por el estado nutricional temprano. Por tanto, los efectos a largo plazo están influidos por el sexo, ya que las hembras se ven más “protegidas” contra las intervenciones sobre la nutricional prenatal y postnatal temprana, en concordancia con estudios previos (Boubred y cols., 2009). Por otra parte, la introducción de la sacarosa en la dieta en la etapa adulta genera cambios en los niveles circulantes de leptina, cambios que fueron más evidentes en los machos expuestos previamente a una sobrenutrición o a una malnutrición neonatal. Por tanto, estos los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que la nutrición neonatal y el sexo son factores fundamentales que determinan el peso del adulto así como condicionan la respuesta a manipulaciones metabólicas posteriores, lo que ha de tenerse en cuenta para la correcta interpretación de los datos en trabajos centrados en el estudio de la función metabólica.

Efecto de la sobrenutrición neonatal sobre el metabolismo en la respuesta a una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta y en la respuesta a una dieta rica en sacarosa desde el destete.

Sobrenutrición neonatal en machos

Una vez determinado el efecto dimórfico de la nutrición temprana, decidimos profundizar en el estudio de los efectos de la sobrenutrición neonatal, utilizando sólo ratas macho. Como se ha descrito previamente, la sobrenutrición neonatal genera un incremento de la ingesta en la etapa adulta y un consecuente incremento de peso corporal, incluso cuando se sigue una dieta normal tras la lactancia (Plagemann, 1999a; Boullu-Ciocca y cols., 2005; Glavas y cols., 2010).

En el estudio realizado para determinar el efecto de una dieta rica en sacarosa mantenida durante dos semanas en machos adultos, llama la atención que esa mayor ingesta detectada en las ratas sobrealimentadas neonatalmente no se detecte a día postnatal 60, observándose que la ingesta total de estos animales desde ese momento y hasta el sacrificio, el día postnatal 75, es menor que la ingesta de los controles, lo que además se acompaña de una menor ingesta líquida. Este hecho se traduce en un menor consumo calórico durante estas dos semanas. Sin embargo, y a pesar de ese menor consumo energético, tanto la ganancia de peso en este periodo como el peso corporal absoluto en el momento de sacrificio son mayores en el grupo de ratas con sobrealimentación neonatal. Esas diferencias en la ingesta de estos animales hacen pensar que se encuentran continuamente reajustándose, de manera que si se hubiesen realizado las determinaciones en otro momento podría haberse observado el incremento en la ingesta. Sin embargo, en experimentos posteriores, las ratas sobrenutridas neonatalmente si mantienen una mayor ingesta durante toda su vida, con independencia del tipo de dieta que lleven. Por ello, tienen un mayor consumo calórico durante todo el experimento y presentan un peso corporal en el momento del sacrificio significativamente mayor que las ratas control.

Los resultados obtenidos indican que, además de por la ingesta, la eficiencia metabólica también se ve afectada por la sobrenutrición neonatal, ya que, con independencia de la cantidad de comida que ingerían posteriormente, las ratas

sobrenutridas durante la lactancia ganaron más peso que las procedentes de camadas de tamaño normal, lo que sugiere una disminución del gasto energético.

No ha de descartarse la diferencia en la longitud del cuerpo como uno de los factores que contribuyen al mayor peso corporal en ratas con sobrenutrición neonatal (Rodrigues y cols., 2011), aunque en estos estudios no lo hemos determinado. Este mayor crecimiento podría estar relacionado con una mayor masa proteica en estos animales (Rodrigues y cols., 2011), lo que queda reflejado en el incremento de la masa muscular que presentan las ratas sobrealimentadas neonatalmente en el momento del sacrificio. Además, parte de esa diferencia de peso se debe al incremento de los depósitos de grasa visceral, de acuerdo con estudios previos (Plagemann y cols., 1999; Boullu-Ciocca y cols., 2005; Dantas y cols., 2010; Rodrigues y cols., 2011), y a la hipertrofia de los adipocitos viscerales (Conceicao y cols., 2011), que es coincidente con el aumento detectado en los niveles circulantes de leptina en las ratas sobrealimentadas neonatalmente, tal y como se ha descrito previamente (López y cols., 2007; Rodrigues y cols., 2011). Sin embargo, los niveles de grasa subcutánea no se encuentran afectados por la sobrenutrición neonatal. En estudios previos se ha descrito que en animales jóvenes sobrenutridos neonatalmente sí se detectaron mayores depósitos de grasa subcutánea, pero en la etapa adulta esta diferencia desaparecía y el incremento de peso y grasa detectados se debía a un incremento de la grasa visceral (Rodriguez y cols., 2011).

El incremento de grasa visceral desempeña una función de interés en el desarrollo de resistencia a la insulina, diabetes de tipo 2 y patología cardiovascular (Weiss, 2007; Medina-Bravo y cols., 2011). Dado que la sobrenutrición generó un incremento de la grasa visceral, y teniendo en cuenta la correlación entre el tejido adiposo y resistencia a la insulina, se analizaron los niveles de insulina y de adiponectina en suero tras un periodo de ayuno. La producción de adiponectina es inversamente proporcional a la cantidad de masa adiposa y diversos estudios sugieren que esta hormona modula la acción de la insulina, mejorando la sensibilidad a esta hormona en tejidos periféricos (Matsuzawa, 2006; Turer y cols., 2011). Sin embargo, a pesar del mayor peso corporal y de los mayores depósitos de grasa detectados en animales con sobrenutrición neonatal, estas hormonas no sufrieron modificaciones por efecto de la nutrición neonatal, resultados que concuerdan con los obtenidos en otros estudios previos (Velkoska y cols., 2005; Rodrigues y cols., 2007; Rodrigues y cols., 2011). Aunque diversos estudios consideran que existe un

incremento en los niveles de insulina y de adiponectina por efecto de la sobrenutrición neonatal (Boullu-Ciocca y cols., 2005; Pereira y cols., 2006), los distintos resultados pueden deberse a la diferencia de edad de los animales de estudio.

Las variaciones en las concentraciones circulantes de leptina generadas por las condiciones nutricionales tempranas pueden modificar la expresión de los receptores de leptina en el hipotálamo (Passos y cols., 2004; Pereira-Toste y cols., 2009; Manuel-Apolinar y cols., 2010). De hecho, el aumento de los niveles de leptina inducido por la dieta en adultos produce cambios en el patrón de expresión de los receptores de leptina en los astrocitos y neuronas del hipotálamo (Hsuchou y cols., 2009). En el estudio realizado para determinar el efecto de una dieta rica en sacarosa mantenida durante dos semanas, las ratas sobrenutridas que siguen la dieta normal presentan incrementados los niveles de expresión del receptor de leptina en el hipotálamo, correlacionando con el incremento de los niveles de leptina. Este incremento, que puede indicar un aumento en la sensibilidad a la leptina, podría relacionarse con la disminución de la ingesta detectada durante las dos últimas semanas de vida, ya que cuando las ratas con sobrenutrición neonatal mantienen su ingesta incrementada durante toda su vida no se detecta ese incremento en la expresión del receptor de esta hormona.

La sobrenutrición neonatal generó una disminución en los niveles de ghrelina total. Los niveles de ghrelina acilada también tendieron a reducirse en los grupos de ratas sobrealimentadas durante el periodo de lactancia, de forma similar a lo previamente descrito en humanos y animales (Ariyasu y cols., 2002; Pacifico y cols., 2009). Dado que la ghrelina en su forma activa induce la ingesta y disminuye el metabolismo (Cummings, 2006), la reducción de sus niveles en los individuos con sobrepeso podría ser un mecanismo compensatorio para disminuir su ingesta.

Debemos destacar que las diferencias detectadas en los niveles hormonales de los animales de este estudio con respecto a los del estudio anterior podría deberse a que estos animales, al contrario que en el estudio anterior, se encontraban en ayunas las 12 horas previas al sacrificio.

Sobrenutrición neonatal y duración de una dieta rica en carbohidratos

Hemos comparado la respuesta metabólica a una exposición corta en la etapa adulta (dos semanas) y a una exposición prolongada (dos meses, desde el destete hasta el sacrificio) a una dieta rica en sacarosa con el fin de determinar si el momento de introducción de la dieta o la duración de la misma ejercen efectos diferenciales en la respuesta metabólica y si dichos efectos están condicionados por la nutrición que llevaron durante la lactancia.

La introducción de una dieta rica en sacarosa generó una disminución de la ingesta, tal y como ha sido previamente descrito (**Raben y cols., 2002; Lindqvist y cols., 2008; Alzamendi y cols., 2010; Sheludiakova y cols., 2011**), tanto si la dieta se introducía en la etapa adulta como en el destete. A pesar de presentar un mayor consumo calórico (**Oliva y cols., 2011; Sheludiakova y cols., 2011**), las ratas alimentadas con pienso y una solución de sacarosa presentaron un menor peso corporal que las ratas alimentadas con pienso y agua, con independencia del momento de introducción de la dieta y de la duración de la misma (**Lewis y cols., 1992; Hill y Prentice, 1995; Gibson, 1996; Cambri y cols., 2010**), a pesar de que el efecto de una dieta rica en hidratos de carbono sobre la ganancia de peso corporal no está claro en la literatura. El hecho de que en el estudio de la respuesta diferencial entre los sexos no se observase esta disminución significativa del peso en las ratas alimentadas con sacarosa podría deberse a la cantidad de grupos analizados, lo que podría enmascarar estas diferencias.

La disminución del incremento de peso corporal se acompañó de una reducción del peso del músculo sóleo con ambos paradigmas, consecuencia de la menor ingesta proteica, y del aumento de los depósitos de grasa subcutánea y visceral (**Lomba y cols., 2009; Oliva y cols., 2011; Sheludiakova y cols., 2011**). Cuando la dieta se siguió durante dos semanas en la etapa adulta, el incremento de grasa visceral sólo se observó en el grupo con sobrenutrición neonatal. Esta diferencia en la acumulación de la grasa entre las ratas control y las sobrealimentadas durante la lactancia podría deberse, al menos en parte, al hecho de que el porcentaje de calorías procedentes de la sacarosa fuese mayor en este último grupo, ya que presentaron una mayor ingesta líquida que las ratas control, y por efecto de la nutrición neonatal. A su vez, el incremento de grasa visceral se acompañó de una hipertrofia de los adipocitos viscerales, generado por esta ingesta de sacarosa

(Patel y cols., 2009; Oliva y cols., 2011), y de un incremento de los niveles circulantes de leptina (Lindqvist y cols., 2008). Diversos estudios sugieren que la morfología celular del tejido adiposo puede influir sobre los niveles plasmáticos de leptina. Además, estos niveles correlacionan mejor con la hipertrofia del tejido adiposo que con la hiperplasia del mismo (Couillard y cols., 2000; Lundgren y cols., 2007), siendo, el tamaño de los adipocitos, determinante para la secreción de leptina (Skurk y cols., 2007) y predictivo de los niveles circulantes de esta hormona (Couillard y cols., 2000; Lundgren y cols., 2007). Parece ser que los adipocitos de mayor tamaño producen más leptina que los de tamaño más pequeño, de manera que la hipertrofia detectada en las ratas sobrenutridas neonatalmente y alimentadas con sacarosa en la etapa adulta sería, en parte, responsable de ese incremento de los niveles circulantes de leptina. Mientras que en el adulto la hipertrofia es la forma más común para almacenar lípidos, en la etapa prepuberal predomina la hiperplasia (Gustafson y cols., 2009). Al introducir la dieta rica en sacarosa en el momento del destete las ratas sobrenutridas neonatalmente presentaron unos niveles de hipertrofia similares a los de las ratas sobrenutridas neonatalmente y que siguieron una dieta normal. Ya que la introducción de la dieta se realizó en el período prepuberal es posible que se generase un incremento del número de adipocitos para permitir el almacenamiento de la grasa.

La disminución del incremento de peso, a pesar del elevado consumo calórico detectado, sugiere que los animales que siguieron la dieta rica en sacarosa tuvieron un gasto energético mayor que los controles. Diversos estudios han relacionado la ingesta de azúcares con un incremento en la actividad y un consecuente gasto energético mayor (Prinz y cols., 1980; Sheludiakova y cols., 2011). En este sentido, se ha descrito que la orexina estimula el gasto de energía a través del incremento de la actividad física (Novak y cols., 2006). Aunque en este estudio no se determinó la actividad física, el incremento de los niveles hipotalámicos de orexina podría indicar un aumento de la actividad de las ratas que siguieron la dieta rica en sacarosa durante dos semanas en la etapa adulta, lo que podría contribuir a la disminución de peso. Por otra parte, cuando las necesidades energéticas aumentan, los triglicéridos almacenados en los adipocitos sufren lipólisis, transformándose en ácidos grasos libres y glicerol. Estos ácidos grasos son transportados a otros tejidos, donde se degradan para la obtención de energía (Watt y Spriet, 2010). La ingesta de sacarosa durante dos semanas en la etapa adulta produce el

incremento de los ácidos grasos libres, lo que podría indicar una mayor necesidad energética debida al mayor gasto energético de estos animales. Cuando la ingesta de sacarosa se mantiene desde el destete hasta el sacrificio no se detecta incremento en los niveles de ácidos grasos libres ni en los niveles de expresión de orexina, con lo que no se generarían cambios en el gasto energético de estos animales debido a la mayor adaptación a la ingesta de carbohidratos. Por lo tanto, el menor incremento de peso como consecuencia de la ingesta de sacarosa podría deberse a otras causas, tales como la reducción del aporte de proteínas, micronutrientes, fibras y ácidos grasos esenciales producido por la disminución de la ingesta de pienso (Sheludiakova y cols., 2011).

El incremento detectado en los niveles circulantes de insulina en respuesta a una sobrenutrición neonatal y a una dieta rica en sacarosa iniciada en el momento del destete podría deberse al hecho de que los islotes pancreáticos no terminan de formarse hasta después del nacimiento (Kaung, 1994; Grove y Smith, 2003), por lo que los factores metabólicos absorbidos por las crías durante etapas tempranas del desarrollo postnatal influyen en el desarrollo de las células β del páncreas de las crías. Patel y cols. han indicado en estudios recientes que la exposición a elevadas concentraciones de glucosa durante la lactancia modifica la funcionalidad de los islotes pancreáticos de las crías, lo que generará una hiperinsulinemia crónica (Patel y cols., 2009; Patel y Srinivasan, 2010). A la vista de los resultados, podemos indicar que es posible que la introducción de la dieta en el momento del destete también afecte la funcionalidad de estos islotes, incrementando la producción y liberación de insulina de manera crónica.

Los niveles séricos de adiponectina incrementaron por ingesta de sacarosa, tal y como había sido descrito previamente (Kamari y cols., 2007; Tan y cols., 2011). La unión de la adiponectina a sus receptores, también localizados en el hipotálamo (Kos y cols., 2007; Guillod-Maximin y cols., 2009), participa en el control de la homeostasis energética e incrementa la ingesta (Kubota y cols., 2007), por lo que el aumento de los niveles séricos de adiponectina podría estar implicado en el incremento de las Kcal ingeridas por estos animales.

Las dietas ricas en carbohidratos y grasa disminuyen los niveles de ghrelina (Tschöp y cols., 2001; Lee y cols., 2002). Sin embargo, se ha descrito que dietas con una baja cantidad de proteínas elevan los niveles de esta hormona (Lee y cols., 2002; Nakagawa y cols., 2002; Beck y cols., 2003; Williams y cols., 2003; Qader y cols., 2005). Como se ha indicado

anteriormente, el seguimiento de la dieta rica en sacarosa se tradujo en una disminución de la ingesta de pienso y, por tanto, en un menor aporte de proteínas. Dado que los niveles de ghrelina solo aparecen incrementados en las ratas que mantienen esta dieta desde el destete, parece que es necesario un largo periodo de dieta para que se genere este efecto sobre la ghrelina circulante. Hay que indicar, que a pesar de la menor ingesta de proteínas, los niveles séricos de proteínas totales no se encontraban disminuídos en las ratas que siguieron la dieta, lo que indica que éstas no se encontraban malnutridas.

Previamente se ha descrito que la introducción de una dieta rica en sacarosa en etapas tempranas genera cambios en el hipotálamo, incrementando la expresión de los neuropéptidos orexigénicos NPY y AgRP, y disminuyendo los del receptor de leptina de cadena larga (Srinivasan y cols., 2008). En nuestros estudios esos cambios sólo se detectan si la dieta se introduce en el momento del destete, lo que podría explicarse por el hecho de que en ese momento las ratas se encuentran aún desarrollándose. Estos resultados, junto con el incremento detectado en los niveles de ghrelina, indicarían que estas modificaciones que predisponen a la hiperfagia se establecen durante el periodo de inicio de la dieta. Una posible razón que explique estos cambios en el hipotálamo podría ser el cambio de la principal fuente de calorías, los hidratos de carbono, durante un largo periodo de tiempo y desde una edad temprana. En la rata, en la que el desarrollo del SNC continúa durante la etapa postnatal, el aumento de la actividad de las enzimas glucolíticas comienza el día 5 postnatal, alcanzando sus actividades máximas entre los días postnatales 21 y 35 (Reiss, 1988; Bilger y Nehlig, 1991). Si en ese momento se introduce un cambio de dieta, cambio mantenido hasta la edad adulta, es lógico que el efecto sea diferente al detectado con dietas introducidas en la etapa adulta, momento en el que el SNC está totalmente desarrollado. Los niveles del receptor de leptina solo están incrementados en respuesta a la sacarosa en las ratas control. El hecho de que no se encuentre incrementado en respuesta a la sacarosa en las ratas sobrenutridas neonatalmente quizá pueda deberse a los mayores niveles de leptina en estas ratas, lo que puede afectar la respuesta del receptor a otros factores.

En los estudios realizados las ratas fueron obligadas a beber sacarosa, ya que no disponían de ningún líquido alternativo. Este hecho podría inducir estrés a los animales pero, sin embargo, los niveles de corticosterona se redujeron en respuesta a la ingesta de sacarosa a corto plazo, lo que podría ser una consecuencia de los efectos placenteros del

azúcar (Berridge, 1996; Drewnowski, 1997; Sclafani, 2004). Como se ha indicado que la corticosterona estimula la adiposidad (Karatsoreos y cols., 2010), está claro que la reducción de esta hormona no participa en el incremento detectado de los depósitos de grasa. Las ratas expuestas a una dieta rica en sacarosa desde el momento del destete no presentaron cambio en los niveles circulantes de corticosterona, lo que podría indicar que hay un habituamiento a esta solución después de un consumo a largo plazo. Por tanto, muchos de los efectos que ejerce la sacarosa sobre el metabolismo dependen del momento en el que esta dieta se introduce y de la duración de la misma.

Efecto de la sobrenutrición neonatal y de una dieta rica en sacarosa sobre los astrocitos y los transportadores de glucosa y de glutamato hipotalámicos

Sobrenutrición neonatal y proteínas estructurales de la glía

Tal y como se ha descrito previamente (Hsuchou y cols., 2009; García-Cáceres y cols., 2011), los niveles de GFAP se encuentran incrementados en las ratas con sobrepeso, las cuales presentan hiperleptinemia. Hemos observado que la leptina aumenta los niveles de GFAP tanto *in vivo* como *in vitro* (García-Cáceres y cols., 2011). En estudios en ratones obesos donde existe una hiperleptinemia inducida por una dieta rica en grasa, los niveles hipotalámicos de GFAP están incrementados (Hsuchou y cols., 2009), mientras que en los ratones *ob/ob*, los cuales presentan niveles de leptina prácticamente nulos, los niveles de este marcador astrocitario están disminuídos, aunque los ratones son obesos (Ahima y cols., 1999). Por tanto, podemos considerar que los niveles de GFAP en el hipotálamo están relacionados con los niveles circulantes de leptina.

Como hemos indicado anteriormente, condiciones de sobrenutrición neonatal se asocian con un incremento en los niveles circulantes de leptina en las crías (López y cols., 2007; Rodrigues y cols., 2011). Dado que esta hormona está implicada en el desarrollo de los astrocitos (Udagawa y cols., 2006), es posible que su incremento en el suero esté ejerciendo un efecto diferenciador sobre estas células en el hipotálamo, lo que iría

asociado al incremento detectado del número de estas células gliales y de sus proyecciones en el ARC de las ratas sobrealimentadas neonatalmente. Además, estas ratas presentan incrementados significativamente los niveles de vimentina y tienden a presentar mayores niveles de PCNA en el hipotálamo, lo que unido al incremento de GFAP y del número de astrocitos, podría indicar un aumento de la proliferación de astrocitos o una activación de los mismos, teniendo en cuenta que los tanicitos, que expresan esta proteína, también podrían encontrarse afectados.

Los astrocitos reactivos se caracterizan por presentar incrementada la expresión de las proteínas estructurales GFAP y vimentina, responsables de conferir el aspecto fibroso a estas células (Halassa y Haydon, 2010). Este hecho nos sugiere que la sobrenutrición neonatal, y el consecuente sobrepeso, han inducido una astrogliosis en el hipotálamo de estas ratas, como sucede en condiciones de obesidad inducida por una dieta rica en grasa (Horvath y cols., 2010), que podría estar relacionado con el incremento de leptina circulante. En roedores, a partir del día postnatal 5 se produce un incremento en los niveles circulantes de leptina, los cuales alcanzan los mayores valores entre los días postnatales 9 y 10 (Ahima y cols., 1998; Cottrell y Ozanne, 2008). Al bloquear este pico, mediante la administración de un antagonista de la leptina el día postnatal 9, disminuye el peso y la masa grasa en ratas adultas (Granado y cols., 2011). Además, hemos visto que estas ratas adultas presentan una disminución marcada en los niveles de GFAP hipotalámico (datos sin publicar). Igualmente, se ha observado que el tratamiento con el antagonista bloquea la respuesta central a la leptina, modificando marcadores de recambio y de maduración celular en el hipotálamo (datos sin publicar). Por lo tanto, a la vista de nuestros resultados, y apoyándonos en estos estudios previos, podríamos indicar que la sobrenutrición neonatal incrementa ese pico de leptina, promoviendo la proliferación de los astrocitos hipotalámicos. Son necesarios más experimentos para determinar si los cambios en el número de astrocitos en respuesta a una sobrenutrición neonatal son debidos a cambios de leptina y/u otras señales.

Sobrenutrición neonatal y transportadores de glucosa y de glutamato

Proteínas que están altamente expresadas en astrocitos, o que en el SNC se expresan exclusiva o mayoritariamente en estas células, como glutamina sintetasa (GS), GLUT-1, GLAST y GLT-1, aumentaron significativamente en los animales sobrenutridos neonatalmente, sugiriendo que el transporte y metabolismo de la glucosa podrían estar alterados en estos animales. Se ha demostrado que la leptina es capaz de estimular la captación de glucosa en las células musculares (**Berti y Gammeltoft, 1999**). Sin embargo, como se analizará más tarde, la administración *icv* de leptina no genera los mismos cambios sobre los transportadores de glucosa y de glutamato que los observados en las ratas con sobrepeso. De hecho, en contraposición con los aumentos observados en estas ratas, los niveles de estas proteínas se redujeron o no se modificaron en respuesta a la leptina. Resultados similares se observan en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos. Por lo tanto, el aumento de los niveles de los transportadores de glucosa y de glutamato observado en el hipotálamo de las ratas sobrealimentadas neonatalmente no se debe al aumento de los niveles circulantes de leptina sino a algunos de los otros múltiples cambios metabólicos que ocurren en estos animales.

Recientemente se ha descrito que la sobreexpresión de GLUT-1 en células gliales del hipotálamo de ratas diabéticas no controladas, con elevados niveles de glucemia, generaba un incremento de la concentración de glucosa en el hipotálamo, apreciándose que dicho incremento conducía a una disminución de la hiperglucemia sistémica (**Chari y cols., 2011**). En este estudio, los investigadores plantean la hipótesis de que la sobreexpresión de GLUT-1, al incrementar la captación de glucosa por la glía, incrementa la concentración de glucosa intracelular y la producción de lactato. Este lactato podrá ser transferido a las neuronas, donde activará vías de señalización que conducen a la inhibición de la producción de glucosa, disminuyendo así la glucemia sistémica. El incremento de GLUT-1 observado en nuestro estudio podría producir ese control de la glucemia periférica en estos animales.

El glutamato estimula la expresión de GLAST, GLT-1 y GS en los astrocitos (**Lehmann y cols., 2009**), lo que sugiere que un aumento en la liberación de glutamato

podría iniciar los mecanismos para la recuperación de este aminoácido desde la hendidura sináptica y, de esta manera, reciclarlo. Por lo tanto, los resultados obtenidos en ratas con sobrepeso sugieren un posible aumento del volumen de intercambio de glutamato hipotalámico. Por el contrario, y como veremos más adelante, los efectos directos de la leptina detectados en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos indican una posible disminución de la captación de glutamato por los astrocitos. De hecho, detectamos unos mayores niveles de este neurotransmisor en el medio de cultivo de astrocitos hipotalámicos tras ser tratados con leptina, lo que es coincidente con la disminución de los niveles de los transportadores de glutamato en estas células. Previamente, se ha demostrado que la leptina inhibe la liberación de glutamato a partir de explantes hipotalámicos (Ponzo y cols., 2004), aunque este efecto es estimulante en el hipotálamo de ratas prepúberes (Ponzo y cols., 2005), sin ningún efecto en las hembras (Reynoso y cols., 2003). En el estudio de administración *icv* de leptina se observa una disminución de GLAST, que podría ser el efecto secundario de una disminución general de la liberación de glutamato neuronal o incluso un efecto directo de la leptina sobre los astrocitos hipotalámicos.

Por otra parte, la actividad cerebral excitatoria va en paralelo con cambios en la absorción y utilización de glucosa (Bak y cols., 2009). Por lo tanto, el aumento de los niveles de los transportadores de glucosa observado, en combinación con el aumento de los transportadores de glutamato y de GS, indicaría un incremento de la actividad excitatoria en el hipotálamo de las ratas con sobrepeso. El efecto que genere este aumento de actividad excitatoria dependerá de qué sistemas neuronales reciban dicha actividad excitatoria, ya que existen poblaciones de neuronas glucosensibles, que se excitan o se inhiben en función de las concentraciones extracelulares de glucosa, generando diferentes respuestas y participando en la regulación del metabolismo energético (Ashford y cols., 1988; Wang y cols., 2004; Marty y cols., 2007). Además, hay que tener presente que los astrocitos están íntimamente asociados a las células neuronales. En consecuencia, cualquier modificación en la expresión y morfología de estas células gliales afectará la funcionalidad de las neuronas.

El aumento en la captación de glucosa no sólo suministra la energía necesaria para el aumento de la actividad neuronal sino que también puede participar en la protección contra la excitotoxicidad del glutamato (Maher y Simpson, 1994; Vannucci y cols., 1996;

Weisová y cols., 2009). La disminución paralela de los transportadores de glucosa y de glutamato en respuesta a los tratamientos con leptina también parece apoyar esta relación entre la actividad excitatoria y el transporte de glucosa.

Sobrenutrición neonatal, dieta rica en sacarosa y proteínas estructurales de la glía

La administración de una dieta de sacarosa en la etapa adulta durante dos semanas, la cual incrementó los depósitos de grasa y los niveles circulantes de leptina, no modificó los niveles proteicos de GFAP en el hipotálamo, pero incrementó los niveles de vimentina, lo que podría indicar un cambio de activación de los astrocitos o tanicitos. Sin embargo, si la dieta se introducía en animales sobrenutridos neonatalmente, los niveles de estas dos proteínas gliales disminuían, lo que podría indicar una pérdida de activación de los astrocitos. Como hemos indicado, los astrocitos reactivos se caracterizan por presentar una mayor complejidad estructural y una mayor expresión de GFAP (Plagemann y cols., 2000). Por tanto, la disminución encontrada en la expresión hipotalámica de esta proteína en el hipotálamo, así como la disminución de vimentina, podría estar relacionada con una reducción en la diferenciación de los astrocitos hipotalámicos. Asimismo, esta disminución de GFAP y de vimentina podría deberse también a la disminución del número de astrocitos o a la de sus proyecciones, al igual que al descenso del número de tanicitos; sin embargo, en este estudio no se realizó el análisis cuantitativo de estas células. Las diferencias detectadas entre los grupos alimentados con sacarosa durante dos semanas, podrían tener su origen en el hecho de que las ratas sobrenutridas neonatalmente presentan durante un largo periodo de tiempo un mayor peso y mayores niveles de leptina que los controles, lo que modificaría el estado de la glía, incrementando la expresión del receptor de leptina e incluso pudiendo modificar la expresión de los receptores de otras citoquinas, lo que modificaría su respuesta a la sacarosa.

Cuando la dieta rica en sacarosa se introdujo en el destete, tanto el grupo control como el grupo de ratas sobrealimentadas neonatalmente, presentaron disminuídos los niveles proteicos de GFAP y los niveles del marcador de proliferación celular PCNA. Esta disminución se acompaña de la reducción del número de astrocitos y del número de proyecciones de estas células gliales, indicando una posible reducción de la proliferación y diferenciación de estas células. Se ha descrito que la hiperglucemia es

capaz de generar un incremento de la apoptosis y una disminución de la proliferación en diversas regiones cerebrales, produciéndose una disminución del número de astrocitos en el hipotálamo (Lechuga-Sancho y cols., 2006a y 2006b). Es posible que la dieta rica en sacarosa mantenida durante dos meses haya sido capaz de incrementar la muerte de los astrocitos en el hipotálamo, aunque se desconocen los niveles centrales de glucosa. Por otra parte, es posible que la ghrelina, cuyos niveles séricos se encuentran incrementados en estos animales, participe en la disminución de los niveles de GFAP, ya que la administración central y crónica de esta hormona generó una disminución significativa en los niveles de GFAP. Los cambios detectados en los niveles de actina podrían deberse al incremento de los niveles circulantes de leptina, ya que esta hormona es capaz de inducir la reorganización de los filamentos de actina en las neuronas (O'Malley y cols., 2007).

Sobrenutrición neonatal, dieta rica en sacarosa y transportadores de glucosa y de glutamato

Los cambios detectados en GFAP y en el número astrocitos por efecto de la administración de una dieta rica en sacarosa están relacionados con los cambios detectados en otras proteínas gliales como los transportadores de glutamato, GS y GLUT-2. Estos cambios podrían deberse a la variación del número de astrocitos y/o a la modificación de su expresión en cada astrocito.

Observamos que la dieta, con independencia del momento de introducción y de su duración, no modificó los niveles de expresión ni los niveles proteicos de GLUT-1 y GLUT-3. Como se indicó con anterioridad, el incremento sistémico de glucosa conduce a un incremento de GLUT-1 en el hipotálamo, para disminuir la hiperglucemia sistémica (Chari y cols., 2011). Al no estar incrementado GLUT-1 podría ser que los niveles periféricos de glucosa no se vean modificados por la dieta.

La disminución detectada de los niveles proteicos de GLUT-2 podría ser debida a la disminución del número de astrocitos. La detección de glucosa por GLUT-2 contribuye al control hipotalámico de la ingesta (Bady y cols., 2006; Stolarczyk y cols., 2010). Dado que la inhibición de GLUT-2 en ratones incrementa la ingesta (Stolarczyk y cols., 2010), podemos pensar que la disminución observada en los niveles proteicos de GLUT-

2 por efecto de la dieta rica en sacarosa podría estar implicada en el incremento de Kcal ingeridas por estos animales.

La introducción de la dieta rica en sacarosa generó diferentes modificaciones en los transportadores de glutamato en función del momento en el que se introdujo y de las condiciones nutricionales tempranas. De este modo, dos semanas de dieta rica en sacarosa generaron un incremento de los transportadores de glutamato, lo que indicaría el incremento de la actividad excitatoria en el hipotálamo de estas ratas. Además, el incremento de los transportadores de glutamato podría estar relacionado con el efecto placentero y reductor de estrés de la ingesta de sacarosa (Ulrich-Lai y cols., 2010), puesto que se ha observado que en modelos de depresión disminuye la captación de glutamato, disminuyendo los niveles de expresión de los transportadores de este neurotransmisor en los astrocitos (Zink y cols., 2010). Es posible que el mantenimiento a largo plazo de la dieta disminuya el efecto placentero de la sacarosa, como hemos comentado anteriormente y como podría sugerir la disminución de los niveles de GLAST y de la isoforma de 51 kDa de GLT-1 en los animales alimentados con sacarosa desde el destete. Estos resultados también podrían indicar una disminución de la actividad excitatoria en el hipotálamo por efecto de una dieta a largo plazo.

A la vista de los resultados obtenidos, los sistemas central y periférico responden a los cambios producidos por la nutrición neonatal y por la introducción de la dieta rica en sacarosa. Por tanto, el fenotipo final de estos animales podría ser el resultado de la interferencia de ambos sistemas. Aunque desconocemos cuáles son las señales que generan esos cambios centrales, las hormonas metabólicas podrían estar implicadas en los mismos. Por ello decidimos estudiar el efecto de la administración de ghrelina y leptina.

Efecto de la ghrelina y de la leptina sobre los transportadores de glucosa y de glutamato en el hipotálamo

Dado que la ghrelina y la leptina son hormonas implicadas en el metabolismo energético, y que sus niveles circulantes se encuentran alterados por efecto de la

nutrición neonatal y por la ingesta de una dieta rica en carbohidratos, se investigó el efecto directo de ambas hormonas sobre los astrocitos y los transportadores de glucosa y de glutamato hipotalámicos. Igualmente, se analizó el efecto del ayuno, para determinar cómo un cambio fisiológico de los niveles circulantes de hormonas metabólicas afecta a los astrocitos y a los transportadores de glucosa y de glutamato hipotalámicos.

Modificación de los niveles de ghrelina y de leptina mediante el ayuno

Es bien conocido que el ayuno conduce a la respuesta adaptativa hormonal y metabólica, generando la disminución de los niveles circulantes de glucosa y triglicéridos, así como de los niveles séricos de leptina e insulina (Heber, 1997; Kmiec y cols., 2005), tal y como se observa en nuestro estudio, donde el ayuno disminuye los niveles séricos de estas dos hormonas.

Por el contrario, observamos que el ayuno incrementa los niveles circulantes de ghrelina total, aunque este incremento solo alcanza la significación tras un ayuno de 12 horas. Estudios previos han determinado que la concentración sérica de ghrelina incrementa por efecto del ayuno (Van der Lely y cols., 2004; Spiegel y cols., 2010; Zhao y cols., 2010) y se reduce tras la ingesta o por la administración central de glucosa (Tschöp y cols., 2000). La existencia de cambios importantes en los niveles plasmáticos de ghrelina asociados a la ingesta parece reafirmar la hipótesis de que la ghrelina circulante derivada del estómago regula los mecanismos centrales relacionados con el apetito. Para determinar si los niveles circulantes de ghrelina se regulan por el estómago lleno o por la ingesta de nutrientes Tschöp y cols. compararon la administración oral de agua con una sonda nasogástrica de 50% de dextrosa en agua, observando que el estómago lleno por el agua no cambiaba los niveles de ghrelina mientras que el estómago lleno de dextrosa redujo significativamente los niveles séricos de esta hormona (Tschöp y cols., 2000).

Estos resultados indican que el ayuno es un buen modelo para modificar fisiológicamente los niveles circulantes de leptina y de ghrelina. Sin embargo, aunque el ayuno genera modificaciones en los niveles de estas dos hormonas, los cambios detectados sobre las proteínas estructurales de la glía y sobre los transportadores de glucosa y de glutamato por efecto del ayuno pueden ser debidos, no sólo a las

modificaciones de dichas hormonas, sino a otra serie de cambios generados por la abolición de la ingesta, como los cambios en los niveles de triglicéridos, ácidos grasos libres, hormona de crecimiento o corticosteroides, entre otros (Cahill y cols., 1966; Maughan y cols., 2010).

El aumento hipotalámico de GFAP y PCNA podría indicar un incremento de la proliferación o una modificación del recambio de los astrocitos consecuencia del ayuno. Previamente se ha descrito que el ayuno genera el incremento de la proteína S100B (Netto y cols., 2006), proteína que se expresa principalmente en astrocitos, tanto astrocitos maduros como en desarrollo (Boyes y cols., 1986; Van Eldik y Wainwright, 2003).

Por otra parte, el ayuno disminuye los niveles proteicos de vimentina. Los estudios *in vitro*, donde los niveles de vimentina de los astrocitos hipotalámicos no se vieron afectados por el tratamiento con ghrelina, apoyan la hipótesis de que podrían ser otros tipos celulares los que se encuentren afectados por el incremento de esta hormona. Por ello, la modificación de vimentina podría deberse a cambios morfológicos de los tanicitos hipotalámicos, células que regulan el paso de sustancias a través de la BHE y que responden a diversos estímulos modificando la expresión de sus proteínas estructurales, como la vimentina, necesarias para la formación de las uniones estrechas que forman la BHE (Frayling y cols., 2011). Es posible que las modificaciones generadas por el ayuno, como el incremento de ghrelina, produzcan esa modificación de los tanicitos, lo que alterará el paso de sustancias a través de la BHE para la adaptación del organismo al nuevo estado metabólico producido por la ausencia de nutrientes.

Por otra parte, dado que la administración central de leptina induce el incremento de vimentina en el hipotálamo (García-Cáceres y cols., 2011), es posible que los niveles disminuidos de esta proteína se deban, al menos en parte, a la disminución de los niveles séricos de leptina por efecto del ayuno.

El ayuno modificó los niveles de los transportadores de glucosa, incrementando GLUT-1 y GLUT-3 y disminuyendo GLUT-2. El aumento de GLUT-1 y GLUT-3 podría indicar que, debido a la restricción calórica, las neuronas y astrocitos necesitan incrementar la captación de glucosa para que generen el ATP necesario para mantener las funciones celulares, haciendo necesario el incremento de dichos transportadores.

Además, el incremento detectado en los niveles del transportador de glutamato GLAST apoyaría esta hipótesis.

En relación a GLUT-2, transportador esencial para el control de la ingesta (Bady y cols., 2006; Stolarczyk y cols., 2010), se ha observado que cantidades reducidas de este transportador en el cerebro previenen el incremento de ingesta (Wan y cols., 1998), por lo que es posible que la disminución de este transportador tras el ayuno afecte la actividad de las neuronas implicadas en la regulación de la ingesta, adaptando al organismo al nuevo estado metabólico.

Efectos periféricos de la administración central de ghrelina

La administración central y crónica de ghrelina incrementa los depósitos de grasa visceral por un mecanismo independiente de la ingesta

La administración crónica de ghrelina en el ventrículo lateral generó un incremento de peso corporal y un aumento de los depósitos de grasa subcutánea y periférica en las ratas que tuvieron un acceso libre a la comida. Estos resultados se apoyan en diversos estudios previos en los que la administración central de ghrelina incrementa la ingesta y la ganancia de peso corporal e induce adiposidad, tanto en humanos como en animales (Tschöp, 2000; Lall y cols., 2001), siendo esta hormona prioritaria en la regulación de la ingesta y de la homeostasis energética (Wren y cols., 2000; Nakazato y cols., 2001; DeBoer, 2008). El incremento de peso observado se produce por estimulación de la ingesta, ya que el grupo de ratas tratadas con ghrelina y que tuvieron restringida la comida no presentó modificaciones en el peso. Además, el tratamiento agudo con esta hormona, que no generó modificaciones en la ingesta, tampoco incrementó el peso corporal de los animales. Estudios previos de administración *icv* aguda de ghrelina mostraron un incremento de la ingesta dos horas después de la administración del tratamiento (Tang-Christensen y cols., 2004). Igualmente, se ha observado que la acción de la ghrelina sobre la ingesta alcanza su máximo efecto a las 4 horas de su administración central (Kamegai y cols., 2000; Lawrence y cols., 2002). Por tanto, no podemos descartar que el tiempo de tratamiento no fuese el suficiente para generar cambios en la ingesta o el peso corporal de los animales.

El incremento de adiposidad puede producirse de manera indirecta, por esa estimulación de la ingesta, o por un efecto directo de la ghrelina sobre el tejido adiposo,

ya que se ha determinado la presencia del receptor de ghrelina GHS-R1a en el tejido adiposo de rata (Choi y cols., 2003), y ya que previamente se ha observado que la ghrelina estimula la adipogénesis e incrementa el número de adipocitos *in vitro* por inhibición de la apoptosis y por la activación de la proliferación y diferenciación (Choi y cols., 2003; Kim y cols., 2004a). El grupo de ghrelina *pair-fed* no tenía incrementados los depósitos de tejido adiposo subcutáneo; sin embargo, sí presentaba mayores depósitos de grasa visceral que los controles, siendo similares a los detectados en el grupo de ghrelina con comida *ad libitum*. Este resultado apoya la teoría de que la ghrelina actúa directamente sobre el tejido adiposo, incrementando los depósitos de grasa visceral por un mecanismo independiente de la secreción de GH y de la ingesta (Thompson y cols., 2004).

La administración central de ghrelina modifica los niveles de las hormonas circulantes implicadas en el metabolismo energético

El tratamiento central con ghrelina, tanto a corto como a largo plazo, generó un incremento significativo de los niveles circulantes de la forma total de esta hormona, sin modificar los niveles de ghrelina acilada. Este hecho sucede en ambos grupos de ratas tratadas con ghrelina, con independencia de la ingesta, por lo que parece tratarse de un efecto directo de la ghrelina, que además indicaría que esta hormona ha atravesado la BHE, la cual regula el transporte de la ghrelina del cerebro a la sangre y viceversa, desempeñando un papel relevante en la acción de esta hormona (Banks y cols., 2002).

En estos animales, la mayor parte de la ghrelina periférica se encontraba desacilada, estando el ratio de acilación disminuido una hora después de la administración del tratamiento, ya que los niveles de ghrelina acilada no se modificaron con el tratamiento. Hay que tener en cuenta que la ghrelina acilada tiene una vida media corta en la circulación (Akamizu y cols., 2005; Toshinai y cols., 2006), metabolizándose rápidamente mediante esterasas circulantes que se encargan de desacilarla. Por tanto, podría ser que la mayor parte de la ghrelina inyectada se hubiese desacilado tras una hora de su administración, lo que lleva a un incremento de los niveles de ghrelina total sin modificar los niveles circulantes de ghrelina acilada, aunque esto está por demostrar.

En diversos estudios se ha referenciado que parte de los efectos de la ghrelina sobre el metabolismo pueden ser consecuencia de sus efectos sobre los niveles

plasmáticos de insulina (Kim y cols., 2004b). De hecho, la ghrelina juega un papel importante en la regulación de la homeostasis de la glucosa a través de la modulación de la secreción de insulina (Reimer y cols., 2003; Heppner y cols., 2011), incrementando la glucemia al disminuir la secreción de insulina inducida por glucosa en los islotes pancreáticos (Dezaki y cols., 2004; Dezaki y cols., 2006). En nuestro estudio, sin embargo, los niveles de glucosa e insulina no se modificaron, tal y como se ha observado en otros estudios de infusión central de ghrelina (Kamegai y cols., 2001; Theander-Carrillo y cols., 2006). Una posible explicación vendría apoyada por diversos estudios que indican que la forma acilada de la ghrelina es capaz de disminuir la sensibilidad a la insulina (Adeghate y Ponery, 2002; Pöykkö y cols., 2003), mientras que la forma desacilada incrementa dicha sensibilidad (Cederberg y cols., 2011). Dado que la ghrelina se desacila rápidamente en la circulación y que la coadministración de ghrelina y ghrelina desacilada regula la producción de insulina en el páncreas (Gauna y cols., 2004), es posible que finalmente no se detecten cambios en los niveles de insulina, ni siquiera una hora después de realizar el tratamiento.

Como cabría esperar, el tratamiento central y crónico con ghrelina incrementó los niveles séricos de leptina, niveles que correlacionan con los cambios de peso y el incremento de adiposidad. En estudios previos se ha observado que el incremento en las concentraciones de ghrelina periférica incrementa la producción de leptina en el tejido adiposo para mantener, de este modo, la homeostasis (Spinedi y Gaillard, 1998). Además, dado que el tratamiento con ghrelina produce un efecto positivo sobre la lipogénesis y/o adipogénesis (Tschöp y cols., 2000), es entendible el incremento de los niveles circulantes de leptina, pues el tejido adiposo es el principal centro productor y liberador de esta hormona, siendo su expresión y secreción reflejo el estado de adiposidad en humanos y en roedores (Frederich y cols., 1995). Este incremento de leptina circulante solo se detectó en los animales tratados con ghrelina que tenían acceso a la comida *ad libitum*. Si se producía una restricción de la comida, los niveles de leptina no se modificaban. Se sabe que la secreción de leptina se lleva a cabo por el tejido adiposo subcutáneo, retroperitoneal y perilinfático, siendo mayor la secreción de esta hormona y la expresión del mensajero de leptina en los depósitos de grasa subcutánea que en los de grasa visceral (Montague y cols., 1997; Van Harmelen y cols., 1998), por lo que es lógico que estos animales, que no presentaban un incremento en los depósitos de grasa subcutánea, no presenten incrementados los niveles circulantes de leptina. Estos resultados vienen

apoyados por los obtenidos en los animales sacrificados una hora después del tratamiento central con ghrelina, los cuales no presentan modificaciones en la ingesta ni en los depósitos de grasa y tampoco tienen modificados los niveles circulantes de leptina.

Efecto central de la administración central de ghrelina

El receptor de ghrelina se expresa en diversos núcleos hipotalámicos, incluido el ARC (Cowley y cols., 2003; Nogueiras y cols., 2004; Zigman y cols., 2006; Kedzia y cols., 2009; Andrews, 2011), donde se ha detectado su expresión en diversas poblaciones neuronales como las neuronas NPY y POMC (Willesen y cols., 1999) y las neuronas liberadoras de hormona de crecimiento (Tannenbaum y cols., 1998). La ghrelina actúa directamente sobre estas células para modificar el metabolismo. Sin embargo, se desconoce si sus efectos sobre la glía se realizan a través del receptor GHS-R1a, 1b u otros receptores no descritos hasta el momento.

La administración central de ghrelina no modifica los niveles de los neuropéptidos hipotalámicos, con independencia de la ingesta

Diversos trabajos en roedores han demostrado que el hipotálamo es el principal centro regulador de la ingesta y del peso corporal (Horvath, 2005; Fioramonti X, 2007), recibiendo señales de distintas hormonas sobre el estado de las reservas energéticas corporales. Es bien conocido que la leptina y la ghrelina, así como la insulina y otras señales metabólicas, pueden modificar la síntesis y secreción de los neuropéptidos y neurotransmisores involucrados en el control metabólico (Cowley, 2003; Ahima y Osei, 2004; Sun y cols., 2007), modificando la actividad de las neuronas NPY y POMC (Cowley, 2003).

El tratamiento central y crónico con ghrelina no generó modificaciones en los niveles de expresión de los neuropéptidos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta. Este hecho puede deberse a que la determinación de los niveles de los neuropéptidos se realizó en todo el hipotálamo en su conjunto; no se aisló el ARC. Además, estos resultados pueden deberse a un efecto compensatorio, dado que al estar incrementados los niveles de leptina circulantes, y atravesar esta hormona la BHE, inhibirían la expresión de los neuropéptidos orexigénicos y estimularían la de los

anorexigénicos, acción contraria a la que ejercería la ghrelina, lo que finalmente equilibraría la expresión de los citados neuropéptidos.

La administración central de ghrelina y su efecto sobre proteínas estructurales gliales

Tanto la ghrelina como la leptina modulan la estructura de los circuitos neuronales, generando cambios morfológicos en el hipotálamo que pueden jugar un papel fundamental en determinados procesos fisiológicos (Pinto y cols., 2004; Horvath, 2005 y 2006; García-Cáceres y cols., 2011). La capacidad del cerebro de modificar sus estructuras celulares en respuesta a determinados estímulos ha sido objeto de estudio en los últimos años. Además, se ha demostrado que ambas hormonas inducen cambios sinápticos rápidos en neuronas hipotalámicas implicadas en el metabolismo (Pinto y cols., 2004; Horvath, 2005 y 2006; García-Cáceres y cols., 2011). Dado que los astrocitos participan en los cambios sinápticos en respuesta a diferentes hormonas (García-Segura y cols., 1996; García-Segura y cols., 1999; Ullian y cols., 2001), y ya que estas células gliales expresan los receptores de leptina (Cheunsuang y Morris, 2005; Pan y cols., 2008; Hsueh y cols., 2009) y de ghrelina (Dixit y cols., 2006), es posible que algunos efectos metabólicos de estas hormonas estén mediados por los astrocitos.

Se ha sugerido una acción de la ghrelina como inductor de la diferenciación y la movilidad astrocitaria tanto en cultivos celulares (Dixit y cols., 2006) como en ratones adultos (Moon y cols., 2009). Sin embargo, nuestros resultados muestran una disminución significativa en los niveles de GFAP con la administración central y crónica de ghrelina. Este efecto no se observa cuando se trata de un tratamiento agudo de 1 hora. Por tanto, la disminución de GFAP observada podría no ser producida de forma directa por la ghrelina sino ser el resultado de algún cambio central o sistémico inducido por el tratamiento crónico de la ghrelina. Los resultados *in vitro* apoyan esta posibilidad, dado que la ghrelina induce un aumento de GFAP en astrocitos aislados.

Se sabe que la administración central de ghrelina facilita la liberación de glucocorticoides (Korbonits y cols., 2004), efecto realizado a través del receptor GHS-R1a (Andrews, 2011; Hansson y cols., 2011). Los cambios detectados en GFAP podrían deberse al efecto que genera la ghrelina sobre estos factores, puesto que hay diversos trabajos que indican que los glucocorticoides son capaces de modificar la expresión de GFAP

tanto *in vivo* (Lambert y cols., 2000) como *in vitro* (Avola y cols., 2004). Por otra parte, ya que está descrito que, en diversos tejidos y tipos celulares, la leptina y la ghrelina tienen efectos antagónicos, incluyendo sus efectos sobre los cambios sinápticos (Pinto y cols., 2005; Klok y cols., 2007; Sun y cols., 2007), cabría pensar que la disminución de GFAP en las ratas tratadas con ghrelina podría deberse a la disminución de la longitud de las proyecciones de los astrocitos, ya que la leptina, genera el efecto opuesto (García-Cáceres y cols., 2011). Sin embargo, datos no publicados de nuestro laboratorio, muestran que el tratamiento *icv* crónico de ghrelina crónica no modifica el número de astrocitos, aunque genera un incremento en la longitud de las proyecciones de los astrocitos del ARC. Ya que el análisis de los niveles de GFAP corresponde a todo el hipotálamo, puede suceder que este marcador astrocitario se encuentre disminuido en otros núcleos hipotalámicos diferentes al ARC.

La administración central y crónica de ghrelina no modificó los niveles del marcador de proliferación celular PCNA, aunque se ha descrito que esta hormona induce proliferación celular en diversas regiones cerebrales como en el hipocampo (Moon y cols., 2009) o en el núcleo motor dorsal del nervio vago (Ammori y cols., 2008). No obstante, no se ha referenciado un efecto proliferativo de esta hormona sobre el ARC. Los niveles de vimentina tampoco están incrementados por efecto de la ghrelina, lo que, acompañado de la estaticidad de los niveles de PCNA, podría indicar que los astrocitos no se encuentran activados por este tratamiento.

La administración central de ghrelina y su efecto sobre los transportadores de glucosa

La ghrelina participa en la homeostasis de la glucosa, desempeñando una función relevante en la regulación de la secreción de la insulina y en el metabolismo de la glucosa (Yada y cols., 2008; Delhanty y Van der Lely, 2011). Además, los núcleos hipotalámicos implicados en el control de la función neuroendocrina y de la homeostasis energética poseen células glucosensibles capaces de detectar y regular, mediante transportadores localizados en sus membranas (Levin, 2004), los niveles circulantes de glucosa (Song y cols., 2001; Levin y cols., 2004; Fioramonti y cols., 2004). Igualmente, se ha descrito que expresan receptores para leptina y ghrelina (Cowley y cols.,

2003; Levin y cols., 2004; Zigman y cols., 2006), por lo que cabe pensar que estas hormonas pueden ejercer parte de su acción a través de los transportadores de glucosa, modificándose así la capacidad de regulación de la homeostasis energética. Los astrocitos participan en el transporte de la glucosa al cerebro y a las neuronas (Pellerin, 2005); sin embargo, se desconoce si esta función está afectada directamente por las hormonas metabólicas de estudio.

El tratamiento central con ghrelina, tanto a corto como a largo plazo, disminuyó los niveles de GLUT-2 y GLUT-3. En el caso del tratamiento crónico esta disminución sólo se observa en las ratas tratadas con ghrelina y con acceso libre a la comida, de manera que la ghrelina disminuye los niveles de estos transportadores a expensas de la ingesta incrementada y/o por el efecto de este aumento de ingesta. Al analizar los niveles de GLUT-3 en la línea de neuronas hipotalámicas RCA-6 no se detectan cambios tras el tratamiento con ghrelina, lo que indicaría que la ghrelina debe activar otros mecanismos para generar esa modificación en los niveles de GLUT-3, cambios que conducirían a una menor captación de glucosa por parte de las neuronas.

La disminución de GLUT-2, transportador localizado fundamentalmente en astrocitos hipotalámicos (Leloup y cols., 1994), va acompañada de la disminución de los niveles de GFAP por efecto del tratamiento crónico de ghrelina. La detección de glucosa por parte de GLUT-2 es fundamental para el control de la ingesta (Bady y cols., 2006; Stolarczyk y cols., 2010), de forma que GLUT-2 detecta los niveles de glucosa para, así, adaptar la ingesta. Los ratones transgénicos nulos en GLUT-2 ($glut2^{-/-}$) tienen incrementada la ingesta y presentan una regulación anormal de la expresión de los neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos en el hipotálamo (Bady y cols., 2006). Este papel de GLUT-2 en el control de la ingesta también se ha observado en humanos (Stolarczyk y cols., 2010). Por tanto, la disminución de GLUT-2 producida por el tratamiento central con ghrelina podría ser, al menos en parte, responsable del incremento de la ingesta, aunque no podemos descartar que ese incremento de ingesta producido por el tratamiento con ghrelina sea el que genere la disminución de este transportador.

La administración central de ghrelina y su efecto sobre los transportadores de glutamato

Los transportadores de glutamato también intervienen en el metabolismo de la glucosa (Serres y cols., 2003; Serres y cols., 2004; Pellerin, 2005; Yi y Hazell, 2006), así como en la modulación de la transmisión sináptica glutamatérgica (Ozawa, 2007). El transporte de glutamato al interior de los astrocitos a través de GLAST y GLT-1 incrementa la glucólisis, para producir energía y proporcionar lactato como sustrato a las neuronas (Serres y cols., 2003; Serres y cols., 2004; Pellerin, 2005), además de reducir la presencia de glutamato en la hendidura sináptica (Ozawa, 2007).

El tratamiento central con ghrelina, tanto a corto como a largo plazo, incrementó los niveles de ambos transportadores de glutamato, pero en el caso del tratamiento de 14 días, este incremento sólo se detectó en el grupo de ratas con comida *ad libitum*, por lo que, probablemente, se trata de un efecto de la ghrelina dependiente de la ingesta, inducido por la ghrelina y por los efectos que genera. Este incremento podría venir dado por una inducción de la liberación de glutamato desde la neurona presináptica a la hendidura sináptica (Yi y Hazell, 2006), haciéndose necesaria la recaptación del glutamato por parte de los astrocitos para retirarlo del espacio sináptico. Por tanto, el incremento de los transportadores de glutamato podría producirse como mecanismo neuromodulador y neuroprotector. Pero además, el incremento de los transportadores de glutamato incrementa a su vez el metabolismo de la glucosa en los astrocitos (Pellerin, 2005; Yi y Hazell, 2006). Dado que los transportadores de glutamato son bombas iónicas que acoplan el transporte de glutamato al simporte o antiporte de Na^+ y K^+ , aprovechando sus gradientes (Cholet y cols., 2002; Yi y Hazell, 2006), su transporte genera una activación de la glucólisis, favoreciendo la formación de lactato, a partir de la glucosa almacenada en estas células, que será utilizado como sustrato energético (Serres y cols., 2003; Serres y cols., 2004; Pellerin, 2005). Por tanto, estos resultados sumados a la disminución de los transportadores de glucosa, podrían indicar que la ghrelina está favoreciendo el empleo de otros sustratos energéticos diferentes a la glucosa.

En consecuencia, la ghrelina modifica los niveles de los transportadores de glucosa y de glutamato en el hipotálamo. No obstante, se desconoce si esos efectos se

producen por la acción directa de esta hormona sobre las células gliales o si son cambios mediados por otras células. Por ello, analizamos los efectos de la ghrelina sobre los transportadores de glucosa y de glutamato en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos y en la línea de astrocitoma de rata C6, dónde, además, determinamos si esta hormona modificaba la localización de los transportadores en la membrana, lugar en que son activos.

El tratamiento con esta hormona resultó en un incremento de los niveles de GLUT-2 en los astrocitos hipotalámicos y en la línea de astrocitoma de rata, donde además se detectó un incremento en los niveles de este transportador en la membrana plasmática. Ya que *in vivo*, el tratamiento central con ghrelina disminuyó los niveles de este transportador, estos resultados indicarían que la ghrelina tiene un efecto directo sobre GLUT-2 en los astrocitos. Es posible que *in vivo* existan otras modificaciones, producidas por la propia ghrelina, por la ingesta o por otras señales, que generen cambios inversos sobre GLUT-2. Además, es posible que los cultivos primarios de astrocitos respondan de manera diferente porque proceden de ratas de edad temprana y la línea C6 porque es tumoral.

Tal y como se observó en el modelo *in vivo*, la ghrelina incrementó los niveles proteicos de GLAST, tanto en los astrocitos hipotalámicos como en la línea de astrocitoma de rata, incremento detectado en los niveles de este transportador en la membrana celular de la células C6. Además, en los cultivos primarios de astrocitos, la ghrelina generó una disminución de los niveles de glutamato en el medio. Esta disminución podría indicar una disminución de la liberación de glutamato por parte de los astrocitos o una mayor captación del glutamato por estas células. Dado que los cambios detectados en estos transportadores por efecto de la ghrelina fueron similares en cultivos primarios y en el astrocitoma de rata, es posible que el incremento de GLAST en la membrana plasmática de las C6 se produzca también en los astrocitos hipotalámicos en cultivo, lo que generaría una mayor captación de glutamato y la consiguiente disminución de este neurotransmisor en el medio de cultivo.

La captación de glutamato genera la activación de la glucólisis (Pellerin, 2005), lo que puede incrementar la demanda energética de estas células, de ahí el incremento de los niveles de GLUT-2 localizado en la membrana tras 24 horas de tratamiento con ghrelina. Estos resultados corroborarían la hipótesis de que la ghrelina generaría una activación del metabolismo en los astrocitos.

Resultados preliminares del laboratorio indican que el tratamiento con ghrelina también incrementa los niveles proteicos de GLAST y de GLUT-2 en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos de ratón (datos no mostrados). Sin embargo, en ratones *knock-out* del receptor de ghrelina GHS-R1a, no observamos dichas modificaciones (datos no mostrados). Aunque no se puede descartar la existencia de otro receptor de ghrelina distinto del 1a en astrocitos, los resultados obtenidos parecen indicar que los efectos de la ghrelina sobre los transportadores de glucosa y de glutamato se producen vía este receptor en los astrocitos. De hecho, se ha descrito que el receptor de ghrelina GHS-R1a está sobreexpresado en astrocitomas celulares, pero también se ha detectado su expresión en cultivos primarios de astrocitos humanos (Dixit y cols., 2006). En los cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos de rata no detectamos expresión de este receptor, lo que podría deberse, a la vista de los resultados, a la baja expresión de este receptor en dichas células. También es posible que la isoforma de este receptor en astrocitos sea diferente del expresado en las neuronas, por lo que no lo detectamos con las sondas de expresión empleados en la *RT-PCR*.

Efectos periféricos de la administración central de leptina

La administración central de leptina disminuye el peso corporal sin modificar los niveles circulantes de las hormonas metabólicas

Los resultados obtenidos en referencia al peso de las ratas que reciben un tratamiento crónico y central de leptina, se apoyan en diversos estudios en los cuales la administración central de leptina provoca una pérdida de apetito y una disminución del peso corporal (Flier y Maratos-Flier, 1998; Friedman y Halaas, 1998). La leptina interviene, por tanto, en la homeostasis energética evitando un incremento excesivo del tejido adiposo (Campfield y cols., 1998). Sin embargo, la administración central de esta hormona no generó cambios significativos en ninguna de las hormonas circulantes analizadas, a pesar de que diversos estudios demuestran efectos de la administración de leptina sobre los niveles circulantes de insulina y ghrelina (Williams y Mobarhan, 2003).

Cuando se produce una pérdida de peso, debida a la pérdida de masa grasa, se produce una disminución de los niveles circulantes de leptina (Klok y cols., 2007; Rolland y cols., 2011). El hecho de no detectar esta disminución parece indicar que la leptina administrada centralmente está incrementando los niveles de leptina circulante

atravesando la BHE, evitando así la modificación normal de los niveles circulantes de leptina con una pérdida de masa grasa. Este hecho podría explicar la ausencia de cambios en los niveles circulantes de otras hormonas, como la insulina o la ghrelina. Algunos autores apuntan que la leptina ejerce una regulación de la ghrelina circulante en roedores (Friedman y Halaas, 1998); sin embargo, otros estudios apoyan nuestros resultados, dado que no han detectado un efecto directo de la leptina administrada *icv* sobre los niveles de ghrelina (Tschöp y cols., 2001, Chan y cols., 2004). Podría ser que la leptina circulante sí tenga efecto sobre los niveles séricos de ghrelina, mientras que la leptina central no. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que estas dos hormonas participan en el control del metabolismo energético de forma independiente (Klok y cols., 2007).

Efectos centrales de la administración de leptina

Los receptores de leptina se expresan en diversas áreas cerebrales, como en el hipotálamo (Tartaglia, 1997; Hakansson y cols., 1998; Donato y cols., 2009; Myers y cols., 2009), donde esta hormona actúa regulando la ingesta y el incremento de peso. Además, se ha determinado la expresión de receptores de leptina en los astrocitos (Cheunsuang y Morris, 2005; Pan y cols., 2008; Hsueh y cols., 2009), expresión que se ve alterada tras el aumento en los niveles de leptina inducido por la dieta (Hsueh y cols., 2009). Con estas premisas determinamos el efecto de la administración central y crónica de leptina sobre proteínas estructurales gliales y sobre los transportadores de glucosa y de glutamato en el hipotálamo, así como el efecto directo de esta hormona sobre los astrocitos hipotalámicos de rata en cultivo primario y sobre una línea de astrocitoma de rata.

La leptina induce la activación y diferenciación de los astrocitos hipotalámicos y modifica los niveles proliferativos en el hipotálamo

Los niveles del marcador astrocitario GFAP incrementaron por efecto de la administración central y crónica de leptina (García-Cáceres, 2011), tal y como sucede en modelos de obesidad, donde se detecta una hiperleptinemia (Hsueh y cols., 2009; Horvath y cols., 2010). Además, previamente se ha demostrado que la leptina es capaz de modificar las conexiones sinápticas en el hipotálamo (Pinto y cols., 2004) y que los astrocitos pueden modificar la eficacia sináptica, no sólo por su participación en la

retirada del glutamato de la hendidura sináptica, sino también mediante el control de las concentraciones iónicas extracelulares, cambiando así la excitabilidad neuronal (Araque y Navarrete, 2010), por lo que podría ser que los astrocitos participen en la remodelación sináptica que induce la leptina en el hipotálamo. De hecho, la administración central y crónica de leptina induce un incremento en la longitud de las proyecciones de los astrocitos hipotalámicos en ratas (García-Cáceres y cols., 2011), lo que podría estar relacionado con el incremento detectado en los niveles de GFAP en las ratas tratadas con leptina. Igualmente, se detecta un incremento en los niveles hipotalámicos de vimentina, marcador de astrocitos inmaduros y activados. Por su parte, el tratamiento con leptina durante 24 horas en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos incrementó los niveles proteicos de GFAP (García-Cáceres y cols., 2011). Por tanto, y dado que los astrocitos reactivos presentan un incremento en la expresión de GFAP y vimentina (Halassa y Haydon, 2010), podría ser que la leptina ejerza un efecto diferenciador en los astrocitos hipotalámicos.

En los cultivos primarios de astrocitos la leptina incrementó los niveles de expresión del receptor de leptina ObRb. Previamente se había determinado la sobreexpresión de este receptor en los astrocitos del hipotálamo en respuesta a elevadas concentraciones de leptina (Hsueh y cols., 2009); sin embargo, se desconocía si esta hormona regulaba de manera directa la expresión de su receptor en los astrocitos del hipotálamo.

La leptina no modifica los niveles de los transportadores de glucosa en los astrocitos hipotalámicos

El tratamiento con leptina no alteró los niveles hipotalámicos de GLUT-1 o GLUT-2. Al analizar los niveles de GLUT-2 en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos así como en la línea de astrocitoma de rata C6, observamos que la leptina no ejerce ningún efecto sobre el mismo, por tanto, parece que esta hormona no modifica la captación de glucosa en estas células gliales.

Sin embargo, el tratamiento *icv* con leptina disminuyó significativamente los niveles de GLUT-3, transportador que en cerebro se localiza casi exclusivamente en neuronas, siendo su principal transportador de glucosa (Maher y cols., 1992; Nagamatsu y

cols., 1993; McCall y cols., 1994; Gerhart y cols., 1995). En la línea de neuronas hipotalámicas RCA-6 también observamos una disminución de GLUT-3 tras el tratamiento con leptina, resultado que apoyaría la hipótesis de que la leptina genera una disminución de la captación de glucosa por parte de las neuronas.

La leptina disminuye los niveles de los transportadores de glutamato en el hipotálamo

El tratamiento *icv* con leptina disminuyó los niveles hipotalámicos de los transportadores de glutamato GLT-1 y GLAST. El mismo efecto lo observamos en tanto en astrocitos primarios de hipotálamo como en la línea de astrocitoma de rata C6, donde además disminuyeron los niveles proteicos de GLAST en la membrana plasmática.

Además, los niveles de glutamato liberado al medio de cultivo de los astrocitos primarios estaban incrementados por el tratamiento con leptina, lo que podría ser debido al incremento de la secreción de este neurotransmisor por parte de los astrocitos o como consecuencia de la disminución de los niveles de los transportadores de glutamato en estas células, lo que disminuiría la recaptación del glutamato. Dado que está descrito que la leptina y la ghrelina ejercen efectos antagónicos en diversos tejidos y tipos celulares (Klok y cols., 2007; Sun y cols., 2007) es posible que esta disminución de los transportadores sea consecuencia de una reducción de la liberación de glutamato desde la neurona presináptica a la hendidura sináptica por efecto de la leptina, dado que con ghrelina se detecta el efecto contrario (Yi y Hazell, 2006). Ya que el aumento de los transportadores de glutamato incrementa a su vez el metabolismo de la glucosa en los astrocitos (Pellerin, 2005; Yi y Hazell, 2006), esta disminución podría ir en detrimento del metabolismo glucídico en estas células.

En conjunto, los resultados obtenidos apuntan que los astrocitos juegan un papel fundamental en el control metabólico, participando en el transporte de glucosa y de glutamato, lo que podría ser mediado por alteraciones en hormonas metabólicas como la ghrelina y la leptina.

VII. CONCLUSIONES

1. El consumo energético neonatal en la rata condiciona las características de la ingesta y la composición corporal a largo plazo, siendo los machos más susceptibles que las hembras a algunas condiciones de malnutrición postnatal temprana.
2. La sobrenutrición neonatal y el consecuente incremento ponderal, inducen astrogliosis en el hipotálamo de ratas macho, presumiblemente debido a la existencia de hiperleptinemia.
3. La sobrenutrición neonatal modifica los mecanismos de transporte de glucosa y de glutamato en el hipotálamo de ratas macho. Dicha anomalía podría ser responsable de las respuestas alteradas a cambios metabólicos.
4. Los cambios metabólicos producidos por una dieta rica en sacarosa dependen de la presencia o ausencia de sobrenutrición neonatal y del momento de introducción y duración de la misma, presenciándose los cambios más acusados cuando la sacarosa se introduce en la alimentación en etapas más tempranas.
5. La leptina y la ghrelina muestran efectos directos sobre los astrocitos hipotalámicos, modulando los mecanismos de transporte de glucosa y de glutamato. Dicha modulación, podría estar en relación con los efectos metabólicos centrales de ambas hormonas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abi-Saab WM, Maggs DG, Jones T, Jacob R, Srihari V, Thompson J, Kerr D, Leone P, Krystal JH, Spencer DD, During MJ, Sherwin RS. Striking differences in glucose and lactate levels between brain extracellular fluid and plasma in conscious human subjects: Effects of hyperglycemia and hypoglycemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002; 22: 271-279.
- Adeghate E, Ponery AS. Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *J Neuroendocrinol*, 2002; 14 (7): 555-560.
- Ahima RS, Prabakaran D, Flier JS. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest*, 1998; 101: 1020-1027.
- Ahima RS, Bjorbaek C, Osei S, Flier JS. Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology*, 1999; 140(6): 2755-2762.
- Ahima RS, Osei S. Leptin signaling. *Physiology Behav*, 2004; 81: 223-241.
- Ahima RS. Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol Metab*, 2005; 16: 307-313.
- Akamizu T, Shinomiya T, Irako T, Fukunaga M, Nakai Y, Nakai Y, Kangawa K. Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90(1): 6-9.
- Albrecht J, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. *Front Biosci*, 2007; 12: 243-332.
- Alzamendi A, Castrogiovanni D, Ortega HH, Gaillard RC, Giovambattista A, Spinedi E. Parametrial Adipose Tissue and Metabolic Dysfunctions Induced by Fructose-rich Diet in Normal and Neonatal-androgenized Adult Female Rats. *Obesity (Silver Spring)*, 2010; 18(3): 441-448.
- Ammori JB, Zhang WZ, Li JY, Chai BX, Mulholland MW. Effects of ghrelin on neuronal survival in cells derived from dorsal motor nucleus of the vagus. *Surgery*, 2008; 144: 159-167.
- Anand BK, Brobeck JR. Localization of a feeding center in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1951; 77: 323-324.
- Andersson U, Filipsson K, Abbot CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D, Small CJ. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem*, 2004; 279: 12005-12008.
- Andrews ZB. The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function. *Trends Neurosci*, 2011; 34 (1): 31-40.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*, 1999; 22: 208-215.
- Araque A. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol*, 2008; 4: 3-10.
- Araque A, Navarrete M. Glial cells in neuronal network function. *Phil Trans R Soc B*, 2010; 365: 2375-2381.
- 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.
- 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(6): 833-838.
- Argente J, Gracia R, Ibáñez L, Oliver A, Borrajo E, Vela A, López-Siguero JP, Moreno ML, Rodríguez-Hierro F; Spanish SGA Working Group. Improvement in growth after two years of growth hormone

therapy in very young children born small for gestational age and without spontaneous catch-up growth: results of a multicenter, controlled, randomized, open clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007; 92(8): 3095-3101.

Argente J. Present and future perspectives in paediatric endocrinology in Spain. *An Pediatr (Barc)*, 2011; 74(2): 69-73.

Ariyasu H, Takaya K, Hosoda H, Iwakura H, Ebihara K, Mori K, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the active form of ghrelin. *Endocrinology*, 2002; 143(9): 3341-3350.

Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut*, 2005; 54(1): 18-24.

Ashford MLJ, Sturgess NJ, Trout NJ, Gardner NJ, Hales CN. Adenosine-5-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. *Pflugers Arch*, 1988; 412: 297-304.

Aubert A, Pellerin L, Magistretti PJ, Costalat R. A coherent neurobiological framework for functional neuroimaging provided by a model integrating compartmentalized energy metabolism. *Proc Natl Acad Sci*, 2007; 104: 4188-4193.

Avena NM, Bocarsly ME, Rada P, Kim A, Hoebel BG. After daily bingeing on a sucrose solution, food deprivation induces anxiety and accumbens dopamine/acetylcholine imbalance. *Physiology & Behavior*, 2008; 94(3): 309-315.

Avola R, Tullio MAD, Fisichella A, Tayebati SK, Tomassoni D. Glial fibrillary acidic protein and vimentin expression is regulated by glucocorticoids and neurotrophic factors in primary rat astroglial cultures. *Clin Exp Hypertens*, 2004; 26 (4): 323-333.

Bady I, Marty N, Dallaporta M, Emery M, Gyger J, Tarussio D, Foretz M, Thorens B. Evidence from glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. *Diabetes*, 2006; 55: 988-995.

Bak LK, Walls AB, Schousboe A, Ring A, Sonnewald U, Waagepetersen HS. Neuronal glucose but not lactate utilization is positively correlated with NMDA-induced neurotransmission and fluctuations in cytosolic Ca²⁺ levels. *J Neurochem*, 2009; 109(1): 87-93.

Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*, 1996; 17: 305-311.

Banks WA, Tschöp M, Robinson SM, Heiman ML. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002; 302: 822-827.

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

Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)*, 1998; 95:115-28.

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.

Barzon L, Pacenti M, Masi G, Stefani AL, Fincati K, Palú G. Loss of growth hormone secretagogue receptor 1a and overexpression of type 1b receptor transcripts in human adrenocortical tumors. *Oncology*, 2005; 68(4-6): 414-421.

Baskin DG, Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Porte Jr. D, Breininger JF, Jonak Z, Schaefer J, Krouse M, Burghardt C, Campfield LA, Burn P, Kochan JP. Leptin receptor long-form is a progressive increase of plasma leptin and decrease in and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate leptin sensitivity, which implies a progressive desensitisation- nucleus. *J Histochem Cytochem*, 1999; 47: 353-362.

- 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.
- Beck B, Musse N, Stricker-Krongrad A. Ghrelin, macronutrient intake and dietary preferences in Long-Evans rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002; 292(4): 1031-1035.
- Bedendi I, Alloatti G, Marcantoni A, Malan D, Catapano F, Ghé C, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G. Cardiac effects of ghrelin and its endogenous derivatives des-octanoyl ghrelin and des-Gln14-ghrelin. *Eur J Pharmacol*, 2003; 476(1-2): 87-95.
- Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV, Warren VA, Howard AD, Van der Ploeg LH, Heck JV. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *Med Chem*, 2000; 43: 4370-4376.
- Bellinger L, Lilley C, Langley-Evans SC. Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. *Br J Nutr*, 2004; 92: 513-520.
- 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 (Lond)*, 2006; 30: 729-738.
- Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial strain in tissue culture. *Science*, 1968; 161: 370-371.
- Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*, 2002; 53: 409-435.
- Berridge KC. Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neurosci Biobehav Rev*, 1996; 20: 1-25.
- Berti L, Gammeltoft S. Leptin stimulates glucose uptake in C2C12 muscle cells by activation of ERK2. *Mol Cell Endocrinol*, 1999; 157(1-2): 121-130.
- Beschorner R, Dietz K, Scahuer N, Mittelbronn M, Schluesener HJ, Trautmann K, Meyemann R, Simon P. Expression of EAAT1 reflects a possible neuroprotective function of reactive astrocytes and activated microglia following human traumatic brain injury. *Histol Histopathol*, 2007a; 22(5): 515-526.
- Beschorner R, Simon P, Chauer N, Mittelbronn M, Schluesener HJ, Trautmann K, Dietz K, Meyermann R. Reactive astrocytes and activated microglial cells express EAAT1, but not EAAT2, reflecting a neuroprotective potential following ischaemia. *Histopathology*, 2007b; 50(7): 897-910.
- Bilger A, Nehlig A. Quantitative histochemical changes in enzymes involved in energy metabolism in the rat brain during postnatal development. I. Cytochrome oxidase and lactate dehydrogenase. *Int J Dev Neurosci*, 1991; 9(6): 545-553.
- Birnbaum MJ, Haspel HC, Rosen OM. Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucosetransporter protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 5784-5788.
- Boado RJ, Pardridge WM. Glucose deprivation causes posttranscriptional enhancement of brain capillary endothelial glucose transporter gene expression via GLUT1 mRNA stabilization. *J Neurochem*, 1993; 60: 2290-2296.
- Boersma B, Wit JM. Catch-up growth. *Endocrine reviews*, 1997; 18(5): 646-661.
- Bonansco C, Couve A, Perea G, Ferradas C, Roncagliolo M, Fuenzalida M. Glutamate released spontaneously from astrocytes sets the threshold for synaptic plasticity. *Eur J Neurosci*, 2011; 33(8): 1483-1492.

- 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.
- Boubred F, Daniel L, Buffat C, Feuerstein JM, Tsimaratos M, Oliver C, Dignat-George F, Lelièvre-Pégorier M, Simeoni U. Early postnatal overfeeding induces early chronic renal dysfunction in adult male rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009; 297: F943-F951.
- 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.
- 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.
- Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science*, 2004; 304: 108-110.
- Bouret SG, Simerly RB. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clin Genet*, 2006; 70: 295-301.
- 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.
- Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest*, 1985; 76: 1501-1513.
- Boyes BE, Kim SU, Lee V, Sung SC. Immunohistochemical co-localization of S-100b and the glial fibrillary acidic protein in rat brain. *Neuroscience*, 1986; 17: 857-865.
- 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.
- Brant AM, Jess TJ, Milligan G, Brown CM, Gould GW. Immunological analysis of glucose transporters expressed in different regions of the rat brain and central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993; 192: 1297-1302.
- Bray A, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*, 2004; 79: 537-543.
- Bray GA, Bellanger T. Epidemiology, trends, and morbidities of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine*, 2006; 29: 109-117.
- Brobeck JR, Tepperman J, Long CNH. Experimental hypothalamic hyperphagia in the albino rat. *Yale J Biol Med*, 1943; 15: 831-853.
- Brobeck JR. Mechanisms of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiol Rev*, 1946; 26: 541-559.
- Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002; 3: 267-277.
- Burant CF, Davidson NO. GLUT3 glucose transporter isoform in rat testis: localization, effect of diabetes mellitus, and comparison to human testis. *Am J Physiol*, 1994; 267: 1488-1495.

- Burdakov D, Luckman SM, Verkhatsky A. Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Phil Trans R Soc*, 2005; 360: 2227-2235.
- Cahill GF Jr, Herrera MG, Morgan AP, Soeldner JS, Steinke J, Levy PL, Reichard GA Jr, Kipnis DM. Hormone-fuel interrelationships during fasting. *J Clin Invest*, 1966; 45: 1751-1769.
- Cambri LT, Ghezzi AC, Ribeiro C, Dalia RA, Rostom de Mello MA. Recovery of rat growth and lipid profiles in adult rats subjected to fetal protein malnutrition with a fructose-rich diet. *Nutrition Research*, 2010; 3: 156-162.
- Caminos JE, Nogueiras R, Blanco M, Seoane LM, Bravo S, Alvarez CV, García-Caballero T, Casanueva FF, Diéguez C. Cellular distribution and regulation of ghrelin messenger ribonucleic acid in the rat pituitary gland. *Endocrinology*, 2003; 144: 5089-5097.
- Campfield LA, Smith JF, Burn P. Strategies and potential molecular targets for obesity treatment. *Science*, 1998; 280: 1383-1387.
- Carayannopoulos MO, Schlein A, Wyman A, Chi M, Keembiyehetty C, Moley KH. GLUT9 is differentially expressed and targeted in the preimplantation embryo. *Endocrinology*, 2004; 145: 1435-1443.
- Carruthers A. Facilitated diffusion of glucose. *Physiol Rev*, 1990; 70: 1135-1176.
- Cassoni P, Ghe C, Marrocco Tarabra E, Allia E, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Papotti M, Muccioli G. Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. *Eur J Endocrinol*, 2004; 150(2): 173-184.
- Cederberg H, Koivisto VM, Jokelainen J, Surcel HM, Keinänen-Kiukaanniemi S, Rajala U. Unacylated ghrelin is associated with changes in insulin sensitivity and lipid profile during an exercise intervention. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2011; doi: 10.1111/j.1365-2265.2011.04135.x.
- 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.
- Chan JL, Bullen J, Lee JH, Yiannakouris N, Mantzoros CS. Ghrelin levels are not regulated by recombinant leptin administration and/or three days of fasting in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89: 335-343.
- Chari M, Yang CS, Lam CK, Lee K, Mighiu P, Kokorovic A, Cheung GW, Lai TY, Wang PY, Lam TK. Glucose transporter-1 in the hypothalamic glial cells mediates glucose sensing to regulate glucose production in vivo. *Diabetes*, 2011; 60(7): 1901-1906.
- Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre DE, Chen HY and Van der Ploeg LHT. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet*, 2000; 26: 97-102.
- Chen CY, Inui A, Asakawa A, Fujino K, Kato I, Chen CC, Ueno N, Fujimiya M. Des-acyl ghrelin acts by CRF type 2 receptors to disrupt fasted stomach motility in conscious rats. *Gastroenterology*, 2005; 129(1): 8-25.
- 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.
- Chen H, Simar D, Morris MJ. Hypothalamic neuroendocrine circuitry is programmed by maternal obesity: interaction with postnatal nutritional environment. *PLoS One*, 2009; 16: e6259.

- Chen L, Xing T, Wang M, Miao Y, Tang M, Chen J, Li G, Ruan DY. Local infusion of ghrelin enhanced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory through activation of phosphoinositide 3-kinase in the dentate gyrus of adult rats. *Eur J Neurosci*, 2011; 33(2): 266-275.
- Chen LL, Hu X, Zheng J, Kong W, Zhang HH, Yang WH, Zhu SP, Zeng TS, Zhang JY, Deng XL, Hu D. Lipid overaccumulation and drastic insulin resistance in adult catch-up growth rats induced by nutrition promotion after undernutrition. *Metabolism Clinical and Experimental*, 2011; 60: 569-578.
- Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology*, 1997; 138: 4489-4492.
- Cheunsuang O, Morris R. Astrocytes in the arcuate nucleus and median eminence that take up a fluorescent dye from the circulation express leptin receptors and neuropeptide Y Y1 receptors. *Glia*, 2005; 52: 228-233.
- Choi K, Roh SG, Hong YH, Shrestha YB, Hishikawa D, Chen C, Kojima M, Kangawa K, Sasaki S. The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology*, 2003; 144: 754-759.
- Cholet N, Pellerin L, Magistretti PJ, Hamel E. Similar perisynaptic glial localitation for the NA+K+-ATPase alpha 2 subunit and the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex*, 2002; 12: 515-525.
- Chun MR, Lee YJ, Kim KH, Kim YW, Park SY, Lee KM, Kim JY, Park YK. Differential Effects of High-carbohydrate and High-fat Diet Composition on Muscle Insulin Resistance in Rats. *J Korean Med Sci*, 2010; 25(7): 1053-1059.
- Cina C, Maass K, Theis M, Willecke K, Bechberger JF, Naus CC. Involvement of the cytoplasmic C-terminal domain of connexin43 in neuronal migration. *J Neurosci*, 2009; 29: 2009-2021.
- Clarke DD, Sokoloff L. Circulation and energy metabolism of the brain. In: *Basic Neurochemistry*, 1994; 645-680 New York: Raven Press.
- Cloherty EK, Diamond DL, Heard KS, Carruthers A. Regulation of GLUT1-mediated sugar transport by an antiport/uniport switch mechanism. *Biochemistry*, 1996; 35: 13231-13239.
- Conceição EPS, Trevenzoli IH, Oliveira E, Franco JG, Carlos AS, Nascimento-Saba CCA, Moura EG, Lisboa PC. Higher White Adipocyte Area and Lower Leptin Production in Adult Rats Overfed During Lactation. Early Overnutrition and Leptin Synthesis. *Horm Metab Res*, 2011; 43: 513-516.
- Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001; 25(5): 63-67.
- Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci*, 2005; 8: 571-578. Review.
- Cottrell EC, Ozanne SE. Early life programming of obesity and metabolic disease. *Physiol Behav*, 2008; 94: 17-28.
- Couillard C, Mauriège P, Imbeault P, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, Bouchard C, Després JP. Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000; 24: 782-788.
- Couvreur O, Ferezou J, Grippois D, Serougne C, Crépin D, Aubourg A, Gertler A, Vacher CM, Taouis M. Unexpected long-term protection of adult offspring born to high-fat fed dams against obesity induced by a sucrose-rich diet. *PLoS One*, 2011; 6(3): e18043.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 2001; 411: 480-484.

- Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nilni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, 2003; 37: 649-661.
- Cowley MA. Hypothalamic melanocortin neurons integrate signals of energy state. *Eur J Pharmacol*, 2003; 480: 3-11.
- Crowther NJ, Cameron N, Trusler J, Toman M, Norris SA, Gray IP. Influence of catch-up growth on glucose tolerance and beta-cell function in 7-year-old children: results from the birth to twenty study. *Pediatrics*, 2008; 121(6): 1715-1722.
- Cui RJ, Li X, Appleyard SM. Ghrelin inhibits visceral afferent activation of catecholamine neurons in the solitary tract nucleus. *J Neurosci*, 2011; 31(9): 3484-3492.
- Cummings DE. Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav*, 2006; 89(1): 71-84.
- Dagogo-Jack S. Regulation and possible significance of leptin in humans: Leptin in health and disease. *Diabetes Reviews*, 1999; 7: 23-37.
- Dallaporta M, Pecchi E, Pio J, Jean A, Horner KC, Troadec JD. Expression of leptin receptors by glial cells of the nucleus tractus solitarius: possible involvement in energy homeostasis. *J Neuroendocrinol*, 2009; 21: 57-67.
- Dantas EM, Pimentel EB, Gonçalves CP, Lunz W, Rodrigues SL, Mill JG. Effects of chronic treadmill training on body mass gain and visceral fat accumulation in overfed rats. *Braz J Med Biol Res*, 2010; 43(5): 515-521.
- Davies MJ. Evidence for effects of weight on reproduction in women. *Reprod Biomed. Online*, 2006; 12: 551-561.
- Dawson PA, Mychaleckyj JC, Fossey SC, Mihic SJ, Craddock AL, Bowden DW. Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2001; 74: 186-199.
- DeBoer MD. Emergence of ghrelin as a treatment for cachexia syndromes. *Nutrition*, 2008; 24: 806-814.
- Deghenghi R, Papotti M, Ghigo E, Muccioli G. Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *J Endocrinol Invest*, 2001;24(1):RC1-3.
- Delahaye F, Breton C, Risold PY, Enache M, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Lesage J, Vieau D. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology*, 2008; 149: 470-475.
- Delhanty PJ, Van der Eerden BC, Van der Velde M, Gauna C, Pols HA, Jahr H, Chiba H, Van der Lely AJ, Van Leeuwen JP. Ghrelin and unacylated ghrelin stimulate human osteoblast growth via mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways in the absence of GHS-R1a. *J Endocrinol*, 2006; 188(1): 37-47.
- Delhanty PJD, van der Lely AJ. Ghrelin and glucose homeostasis. *Peptides*, 2011; doi:10.1016/j.peptides.2011.03.001.
- Despres JP. Intra-abdominal obesity: an untreated risk factor for Type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J Endocrinol Invest*, 2006; 29 (3): 77-82.

- Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, Yada T. Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca²⁺ signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes*, 2004; 53:3142-3151.
- Dezaki K, Sone K, Koizumi M, Nakata M, Kakei M, Nagai H, Hosoda H, Kangawa K, Yada T. Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes*, 2006; 55: 3486-3493.
- Dezaki K, Sone H, Yada T. Ghrelin is a physiological regulator of insulin release in pancreatic islets and glucose homeostasis. *Pharmacol Ther*, 2008; 118(2): 239-249.
- Dick APK, Harik SI, Klip A, Walker DM. Identification and characterization of the glucose transporter of the bloodbrain barrier by cytochalasin B binding and immunological reactivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; 81: 7233-7237.
- Dienel GA, Hertz L. Glucose and lactate metabolism during brain activation. *J Neurosci Res*, 2001; 66: 824-838.
- Dixit VD, Weeraratna AT, Yang H, Bertak D, Cooper-Jenkins A, Riggins GJ, Eberhart CG, Taub DD. Ghrelin and the growth hormone secretagogue receptor constitute a novel autocrine pathway in astrocytoma motility. *J Biol Chem*, 2006; 281(24):16681-16690.
- Doerge H, Bocianski A, Joost HG, Schurmann A. Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of Horizons in Nutritional Science 7 sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochemical Journal*, 2000; 350: 771-776.
- Doerge H, Bocianski A, Scheepers A, Axer H, Eckel J, Joost HG, Schurmann A (2001) Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochemical Journal*, 2001; 359, 443-449.
- Donato J, Silva RJ, Sita LV, Lee S, Lee C, Lacchini S, Bittencourt JC, Franci CR, Canteras NS, Elias CF. The Ventral Premammillary Nucleus Links Fasting- Induced Changes in Leptin Levels and Coordinated Luteinizing Hormone Secretion. *J Neurosci*, 2009; 29: 5240-5250.
- Drewnowski A. Taste preferences and food intake. *Annu Rev Nutr*, 1997; 17: 237-253.
- Dwyer KJ, Boado RJ, Pardridge WM. Cis-element/ cytoplasmic protein interaction within the 3'-untranslated region of the GLUT1 glucose transporter mRNA. *J Neurochem*, 1996; 66: 449-458.
- El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjørbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest*, 2000; 105(12): 1827-1832.
- Ellacott KL, Cone RD. The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis. *Recent Prog Horm Res*, 2004; 59: 395-408.
- 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.
- Elmqvist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*, 1999; 22: 221-232.
- Emons JA, Boersma B, Baron J, Wit JM. Catch-up growth: testing the hypothesis of delayed growth plate senescence in humans. *J Pediatr*, 2005; 147(6): 843-846.
- 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.
- Escartin C, Valette J, Lebon V, Bonvento G. Neuron-astrocyte interactions in the regulation of brain energy metabolism: NMR spectroscopy. *J Neurochem*, 2006; 99: 393-401.

- Even-Zohar N, Jacob J, Amariglio N, Rechavi G, Potievsky O, Phillip M, Gat-Yablonski G. Nutrition-induced catch-up growth increases hypoxia inducible factor 1alpha RNA levels in the growth plate. *Bone*, 2008; 42(3): 505-515.
- Farrell CL, Pardridge WM. Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: An electron microscopic immunogold study. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 5779-5783.
- Ferraris RP. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochem J*, 2001; 360: 265-276.
- Fields RD, Stevens-Graham B: New insights into neuron-glia communication. *Science*, 2002; 298: 556-562.
- Filigheddu N, Gnocchi VF, Coscia M, Cappelli M, Porporato PE, Taulli R, Traini S, Baldanzi G, Chianale F, Cutrupi S, Arnoletti E, Ghè C, Fubini A, Surico N, Sinigaglia F, Ponzetto C, Muccioli G, Crepaldi T, Graziani A. Ghrelin and des-acyl ghrelin promote differentiation and fusion of C2C12 skeletal muscle cells. *Mol Biol Cell*, 2007; 18(3): 986-994.
- Fioramonti X, Lorsignol A, Taupignon A and Penicaud L. A new ATP-sensitive K⁺ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuato nucleus. *Diabetes*, 2004; 53: 2767-2775.
- Fioramonti X, Contié S, Song Z, Routh VH, Lorsignol A, Pénicaud L. Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuato nucleus. *Diabetes*, 2007; 56: 1219-1227.
- Flier JS, Maratos-Flier E. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell*, 1998; 92: 437-440.
- Frago LM, Pañeda C, Dickson SL, Hewson AK, Argente J, Chowen JA. Growth hormone (GH) and GH-releasing peptide-6 increase brain insulin-like growth factor-I expression and activate intracellular signaling pathways involved in neuroprotection. *Endocrinology*, 2002; 143(10): 4113-4122.
- Frago LM, Pañeda C, Argente J, Chowen JA. Growth hormone-releasing peptide-6 increases insulin-like growth factor-I mRNA levels and activates Akt in RCA-6 cells as a model of neuropeptide Y neurones. *J Neuroendocrinol*, 2005; 17(11): 701-710.
- Frayling C, Britton R, Dale N. ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *J Physiol*, 2011; 589(9): 2275-2286.
- Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*, 1995; 1: 1311-1314.
- Freeman MR. Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science*, 2010; 330 (6005): 774-778. Review.
- Friedman JM, Halaas J. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 1998; 395: 763-769.
- Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochemical Journal*. 2006; 393: 7-20.
- Frye C, Heinrich J. Trends and predictors of overweight and obesity in East German children. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003; 27: 963-969.
- Fukumoto H, Seino S, Imura H, Seino Y, Eddy RL, Fukushima Y, Byers MG, Shows TB, Bell GI. Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 85: 5434-5438.

- Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*, 2010; 316(2): 129-139.
- García MA, Millán C, Balmaceda-Aguilera C, Castro T, Pastor P, Montecinos H, Reinicke K, Zúñiga F, Vera JC, Oñate SA, Nualart F. Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J Neurochem*, 2003; 86: 709-724.
- 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.
- García-Cáceres C, Fuente-Martín E, Burgos-Ramos E, Granado M, Frago LM, Barrios V, Horvath T, Argente J, Chowen JA. Differential acute and chronic effects of leptin on hypothalamic astrocyte morphology and synaptic protein levels. *Endocrinology*, 2011; 152(5): 1809-1818.
- García-Segura LM, Chowen JA, Naftolin F. Endocrine glia: roles of glial cells in the brain actions of steroid and thyroid hormones and in the regulation of hormone secretion. *Front Neuroendocrinol*, 1996; 17(2): 180-211.
- García-Segura LM, Naftolin F, Hutchison JB, Azcoitia I, Chowen JA. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol*, 1999; 40: 574-584.
- Garza JC, Guo M, Zhang W, Lu XY. Leptin increases adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem*, 2008; 283(26): 18238-47.
- Gaskin FS, Farr SA, Banks WA, Kumar VB, Morley JE. Ghrelin-induced feeding is dependent on nitric oxide. *Peptides*, 2003; 24: 913-918.
- Gauna C, Meyler FM, Janssen JA, Delhanty PJD, Abribat T, van Koetsveld P, Hofland LJ, Broglio F, Ghigo E, van der Lely AJ. Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89(10): 5035-5042.
- Gauna C, Van der Lely AJ. Somatostatin, cortistatin, ghrelin and glucose metabolism. *J Endocrinol Invest*, 2005; 28(11 Suppl International): 127-131.
- Gerhart DZ, Leino RL, Taylor WE, Borson ND, Drewes LR. GLUT1 and GLUT3 gene expression in gerbil brain following brief ischemia: an *in situ* hybridization study. *Mol Brain Res*, 1994; 25: 313-322.
- Gerhart DZ, Leino RL, Borson ND, Taylor WE, Gronlund KM, McCall AL, Drewes LR. Localization of glucose transporter GLUT3 in brain: Comparison of rodent and dog using species-specific carboxyl-terminal antisera. *Neuroscience*, 1995; 66: 237-246.
- Gibson SA. Are high-fat, high-sugar foods and diets conducive to obesity? *Int J Food Sci Nutr*, 1996; 47: 405-415.
- 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.
- 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.
- Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of the brain. *J Neurochem*, 1966; 13(8): 655-682.
- Gluckman PD, Hanson MA. Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2004; 9(5): 419-425.

Gohlke BC, Stutte S, Bartmann P, Woelfle J. Does gender-specific BMI development modulate insulin sensitivity in extremely low birth weight infants? *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2009; 22: 827-835.

Gómez-Pérez Y, Amengual-Cladera E, Català-Niell A, Thomàs-Moyà E, Gianotti M, Prenza AM, Lladó I. Gender dimorphism in high-fat-diet-induced insulin resistance in skeletal muscle of aged rats. *Cell Physiol Biochem*, 2008; 22: 539-548.

González CR, Vázquez MJ, López M, Diéguez C. Influence of chronic undernutrition and leptin on GOAT mRNA levels in rat stomach mucosa. *J Mol Endocrinol*, 2008; 41(6): 415-421.

Granado M, García-Cáceres C, Frago LM, Argente J, Chowen JA. The positive effects of growth hormone-releasing peptide-6 on weight gain and fat mass accrual depend on the insulin/glucose status. *Endocrinology*, 2010; 151(5): 2008-2018.

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.

Grove KL, Smith MS. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiol Behav*, 2003; 79(1): 47-63.

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.

Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res*, 1997; 48(1): 23-29.

Guillod-Maximin E, Roy AF, Vacher CM, Aubourg A, Bailleux V, Lorsignol A, Pénicaud L, Parquet M, Taouis M. Adiponectin receptors are expressed in hypothalamus and colocalized with proopiomelanocortin and neuropeptide Y in rodent arcuate neurons. *J Endocrinol*, 2009; 200(1): 93-105.

Gustafson B, Gogg S, Hedjazifar S, Jenndahl L, Hammarstedt A, Smith U. Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009; 297:999-1003.

Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE, Hale JE. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105(17), 6320-6325.

Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci*, 1998; 1: 271-272.

Haines DE. Lippincott's Illustrated Q&A Review of Neuroscience. 2010. ISBN/ISSN: 9781605478227.

Hakansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC, Meister B. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci*, 1998; 18: 559-572.

Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidahusein N, Denton DA, Friedman JM. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1997; 94: 8878-8883.

Halassa MM, Haydon PG. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol*, 2010; 72: 335-355.

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

- Halford JC, Blundell JE. Pharmacology of appetite suppression. *Prog Drug Res*, 2000; 54: 25-58.
- Han TS, Tajar A, Lean ME. Obesity and weight management in the elderly. *Br Med Bull*, 2011; 97: 169-196.
- Hansson C, Haage D, Taube M, Egecioglu E, Salomé N, Dickson SL. Central administration of ghrelin alters emotional responses in rats: behavioural, electrophysiological and molecular evidence. *Neuroscience*, 2011; 180: 201-211.
- Harmer SC, Bicknell AB. The role of the melanocortin 3 receptor in mediating the effects of gamma-MSH peptides on the adrenal. *Endocr Res*, 2004; 30: 629-635.
- Harrold JA, Widdowson PS, Williams G. Beta-MSH: a functional ligand that regulated energy homeostasis via hypothalamic MC4-R? *Peptides*, 2003; 24: 397-405.
- Harvey J, Ashford ML. Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. *Neuropharmacology*, 2003; 44: 845-854.
- Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev*, 2005; 63: 133-157.
- Heber D. Endocrine responses to fasting, malnutrition and illness. *DeGroot LJ (ed): Endocrinology. Philadelphia, Saunders*, 1997; 3: 2663-2685.
- Heijmans BT, Tobi EW, Lumey LH, Slagboom PE. The epigenome: Archive of the prenatal environment. *Epigenetics*, 2009; 4(8): 526-531.
- Heppner KM, Tong J, Kirchner H, Nass R, Tschöp MH. The ghrelin O-acyltransferase-ghrelin system: a novel regulator of glucose metabolism. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, 2011; 18: 50-55.
- Hetherington AW, Ranson SW. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec*, 1940; 78: 149.
- Hetherington AW, Ranson SW. The relation of various hypothalamic lesions to adiposity in the rat. *J Comp Neurol*, 1942; 76: 475-499.
- Hewson AK, Dickson SL. Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol*, 2000; 12: 1047-1049.
- Hill JO, Prentice AM. Sugar and body weight regulation. *Am J Clin Nutr*, 1995; 62(suppl): 264-274.
- Hofmann SM, Tschöp MH. Dietary sugars: a fat difference. *J Clin Invest*, 2009; 119: 1089-1092.
- Horvath TL. The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nature Neuroscience*, 2005; 8: 561-565.
- Horvath TL. Synaptic plasticity in energy balance regulation. *Obesity (Silver Spring)*, 2006; 14(5): 228-233.
- Horvath TL, Sarman B, García-Cáceres C, Enriori PJ, Sotonyi P, Shanabrough M, Borok E, Argente J, Chowen JA, Perez-Tilve D, Pfluger PT, Brönneke HS, Levin BE, Diano S, Cowley MA, Tschöp MH. Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; 107: 14875-14880.
- Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000a; 279(3): 909-913.
- Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem*, 2000b; 275(29): 21995-22000.

- Houdijk ME, Engelbregt MT, Popp-Snijders C, Delemarre van der Waal HA. Long-term effects of early postnatal food restriction on growth hormone secretion in rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2003; 27(4): 260-267.
- Houseknecht KL, Baile CL, Matteri RL, Spurlock ME. The biology of leptin: a review. *J Anim Sci*, 1998; 76: 1405-1420.
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 1996; 273: 974-977.
- Hsueh H, He Y, Kastin AJ, Tu H, Markadakis EN, Rogers RC, Fossier PB, Pan W. Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain*, 2009; 132: 889-902.
- 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.
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P and Lee F. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 1997; 88: 131-141.
- Hynes G, Janes P. Leptin and its role in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 2001; 12: 321-327.
- Ibberson M, Uldry M, Thorens B. GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 2000; 275: 4607-4612.
- Isse N, Ogawa Y, Tamura N, Masuzaki H, Mori K, Okazaki T et al. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J Biol Chem*, 1995; 270: 27728-27733.
- Jezová D, Skultétyová I, Makatsori A, Moncek F, Duncko R. Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis function and hedonic behavior in adult male and female rats prenatally stressed by maternal food restriction. *Stress*, 2002; 5: 177-183.
- Jimenez-Chillaron JC, Patti ME. To catch up or not to catch up: is this the question? Lessons from animal models. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2007; 14: 23-29.
- Kamari Y, Grossman E, Oron-Herman M, Peleg E, Shabtay Z, Shamiss A, Sharabi Y. Metabolic stress with a high carbohydrate diet increases adiponectin levels. *Horm Metab Res*, 2007; 39: 384-388.
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology*, 2000; 141 (12): 4797-4800.
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes*, 2001; 50(11): 2438-2443.
- Karastergiou K, Mohamed-Ali V. The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Mol Cell Endocrinol*, 2010; 318(1-2): 69-78.
- Karatsoreos IN, Bhagat SM, Bowles NP, Weil ZM, Pfaff DW, McEwen BS. Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: a potential model of the metabolic syndrome in mouse. *Endocrinology*, 2010; 151(5): 2117-2127.

- Karlberg J, Albertsson-Wikland K. Growth in full-term small-for-gestational-age infants: from birth to final height. *Pediatr Res*, 1995; 38: 733-739.
- Kasahara M, Hinkle PC. Reconstitution and purification of the d-glucose transporter from human erythrocytes. *J Biol Chem*, 1997; 252: 7384-7390.
- Kastin AJ, Pan W. Dynamic regulation of leptin entry into brain by the blood-brain barrier. *Regul Pept*, 2000; 9: 37-43.
- Kaung HL. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn*, 1994; 200(2): 163-175.
- Kedzia A, Obara-Moszynska M, Chmielnicka-Kopaczyk M. Assessment of ghrelin, GHS-R, GH, and neurohormones in human fetal pituitary glands and central nervous system: an immunohistochemical study. *Folia Histochem Cytobiol*, 2009; 47(3): 505-510.
- Kim JY, Nolte LA, Hansen PA, Han DH, Kawanaka K, Holloszy JO. Insulin resistance of muscle glucose transport in male and female rats fed a high-sucrose diet. *Am J Physiol Reg Integ Com Physiol*, 1999; 276: 665-672.
- Kim MS, Yoon CY, Jang PG, Park YJ, Shin CS, Park HS, Ryu JW, Pak YK, Park JY, Lee KU, Kim SY, Lee HK, Kim YB, Park KS. The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*, 2004a; 18: 2291-2301.
- Kim MS, Namkoong C, Kim HS, Jang PG, Kim Pak YM, Katakami H, Park JY, Lee KU. Chronic central administration of ghrelin reverses the effects of leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004b; 28: 1264-1271.
- Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity reviews*, 2007; 8: 21-34.
- Kmiec Z, Pokrywka L, Kotlarz G, Kubasik J, Szutowicz A, Mysliwski A. Effects of Fasting and Refeeding on Serum Leptin, Adiponectin and Free Fatty Acid Concentrations in Young and Old Male Rats. *Gerontology*, 2005; 51: 357-362.
- Knight ZA, Hannan KS, Greenberg ML, Friedman JM. Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance. *PLoS ONE*, 2010; 5(6): e11376.
- 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.
- Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab*, 2001; 12: 118-122.
- Kola B, Boscaro M, Rutter GA, Grossman AB, Korbonits M. Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab*, 2006; 17(5): 205-215.
- Korbonits M, Grossman AB. Growth hormone-releasing peptide and its analogues: novel stimuli to growth hormone release. *Trends Endocrinol Metab*, 1995; 6: 43-49.
- Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB. Ghrelin-a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol*, 2004; 25(1): 27-67.
- Korf J. Is brain lactate metabolized immediately after neuronal activity through the oxidative pathway? *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006; 26: 1584-1586.
- Kos K, Harte AL, da Silva NF, Tontchev A, Chalakov G, James S, Snead DR, Hoggart B, O'hare JP, McTernan PG et al. Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007; 92: 1129-1136.

- Kosodo Y, Huttner WB. Basal process and cell divisions of neural progenitors in the developing brain. *Dev Growth Differ*, 2009; 51: 251-261.
- Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi Tet al. Adiponectin stimulates AMPactivated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metabolism*, 2007; 6(1) 55-68.
- Lall S, Tung LY, Ohlsson C, Jansson JO, Dickson SL. Growth hormone (GH)-independent stimulation of adiposity by GH secretagogues. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; 280: 132-138.
- Lam TK, Gutiérrez-Juárez R, Pocai A, Rossetti L. Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science*, 2005; 309: 943-947.
- Lambert KG, Gerecke KM, Quadros PS, Doudera E, Jasnow AM, Kinsley CH. Activity-stress increases density of GFAP-immunoreactive astrocytes in the rat hippocampus. *Stress*, 2000; 3 (4): 275-284.
- Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FMH, Luckman SM. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology*, 2002. 143(1): 155-162.
- Lechuga-Sancho AM, Arroba AI, Frago LM, Pañeda C, García-Cáceres C, Delgado Rubín de Célix A, Argente J, Chowen JA. Activation of the intrinsic cell death pathway, increased apoptosis and modulation of astrocytes in the cerebellum of diabetic rats. *Neurobiol Dis*, 2006a; 23(2): 290-299.
- Lechuga-Sancho AM, Arroba AI, Frago LM, García-Cáceres C, Delgado Rubín de Célix AD, Argente J, Chowen JA. Reduction in the number of astrocytes and their projections is associated with increased synaptic protein density in the hypothalamus of poorly controlled diabetic rats. *Endocrinology*, 2006b; 147(11): 5314-5324.
- Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH Jr. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology*, 2002; 143: 185-190.
- Lee W, Bondy CA. Ischemic injury induces brain glucose transporter gene expression. *Endocrinology*, 1993; 133: 2540-2544.
- LeFevre PG. Evidence of active transfer of certain non-electrolytes across the human red cell membrane. *J Gen Physiol*, 1948; 31: 505-527.
- Lehmann C, Bette S, Engele J. High extracellular glutamate modulates expression of glutamate transporters and glutamine synthetase in cultured astrocytes. *Brain Res*, 2009; 1297: 1-8.
- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci*, 1995; 15:1835-1853.
- Leloup C, Arluison M, Lepetit N, Cartier N, Marfaing-Jallat P, Ferre P, Penicaud L. Glucose transporter 2 (Glut 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Res*, 1994; 638: 221-236.
- Levin BE, Dunn-Meynell AA, Routh VH. Brain glucose sensing and body energy homeostasis: role in obesity and diabetes. *Am J Physiol*, 1999; 276: 1223-1231.
- Levin BE, Routh VH, Kang L, Sanders NM, Dunn-Meynell A. Neuronal glucosensing. What do we know after 50 years? *Diabetes*, 2004; 53: 2521-2528.
- Levin BE. Epigenetic influences on food intake and physical activity level: review of animal studies. *Obesity* (Silver Spring), 2008; 16(3): 51-54.
- Levin BE, Magnan C, Dunn-Meynell A, Le Foll C. Metabolic sensing and the brain: who, what, where, and how? *Endocrinology*, 2011; 152(7): 2552-2557.

- Lewis C, Park Y, Dexter P, Yetley E. Nutrient intakes and body weights of persons consuming high and moderate levels of added sugars. *J Am Diet Assoc*, 1992; 92: 708-712.
- Lienhard GE, Slot JW, James DE, Mueckler M. How cells absorb glucose. *Sci Am*, 1992; 266: 86-91.
- Lillycrop KA, Phillips ES, Torrens C, Hanson MA, Jackson AA, Burdge GC. Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR α promoter of the offspring. *Br J Nutr*, 2008; 100(2): 278-282.
- Lindqvist A, Baelemans A, Erlanson-Albertsson C. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regul Pept*, 2008; 150: 26-32.
- Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, Kuhajda FP. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science*, 2000; 288: 2379-2382.
- Lomba A, Milagro FI, Garcia-Diaz DF, Campion J, Marzo F, Martinez JA. A high-sucrose isocaloric pair-fed model induces obesity and impairs NDUFB6 gene function in rat adipose tissue. *J Nutrigenet Nutrigenomics*, 2009; 2: 267-272.
- Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest*, 2006; 116(7): 1776-1783. Review.
- López M, Tovar S, Vázquez MJ, Nogueiras R, Seoane LM, García M, Señarís RM, Diéguez C. Perinatal overfeeding in rats results in increased levels of plasma leptin but unchanged cerebrospinal leptin in adulthood. *Int J Obes (Lond)*, 2007; 31(2): 371-377.
- Lu GC, Rouse DJ, DuBard M, Cliver S, Kimberlin D, Hauth JC. The effect of the increasing prevalence of maternal obesity on perinatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol*, 2001; 185: 845-849.
- Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach. *J Nutr*, 1998; 128: 401-406.
- Lucas A. Growth and later health: a general perspective. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*, 2010; 65:1-11.
- Ludwig DS, Peterson KE, Gortmaker SL. Relation between consumption of sugar sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis. *Lancet*, 2001; 357: 505-508.
- Lundgren M, Svensson M, Lindmark S, Renström F, Ruge T, Eriksson JW. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia'. *Diabetologia*, 2007; 50: 625-633.
- Maher F, Vannucci SJ, Takeda J, Simpson IA. Expression of mouse-GLUT3 and human-GLUT3 glucose transporter proteins in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992; 182: 703-711.
- Maher F, Simpson IA. Modulation of expression of glucose transporters GLUT3 and GLUT1 by potassium and N-methyl-D-aspartate in cultured cerebellar granule neurons. *Mol Cell Neurosci*, 1994; 5(4): 369-375.
- Mangia S, Giove F, Tkác I, Logothetis NK, Henry PG, Olman CA, Maraviglia B, Di Salle F, Uğurbil K. Metabolic and hemodynamic events after changes in neuronal activity: Current hypotheses, theoretical predictions and in vivo NMR experimental findings. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009; 29: 441-463.
- Mantych GJ, Hagemann GS, Devaskar SU. Characterization of glucose transporter isoforms in the adult and developing human eye. *Endocrinology*, 1993a; 133: 600-607.
- Mantych GJ, James DE, Devaskar SU. Jejunal/kidney glucose transporter isoform (Glut-5) is expressed in the human blood-brain barrier. *Endocrinology*, 1993b; 132: 35-40.
- Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease. A review of current evidence. *Ann Intern Med*, 1999; 130: 671-680.

- Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim SY, Hamnvik OP. Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011; 301: 567-584.
- Manuel-Apolinar L, Zarate A, Rocha L, Hernández M. Fetal malnutrition affects hypothalamic leptin receptor expression after birth in male mice. *Arch Med Res*, 2010; 41(4): 240-245.
- Martos-Moreno GA, Argente J. Paediatric obesities: from childhood to adolescence. *An Pediatr (Barc)*, 2011; 75(1): 63.e1-23.
- Martos-Moreno GA, Barrios V, Martínez G, Hawkins F, Argente J. Acylated ghrelin levels in pre-pubertal obese children at diagnosis and after weight reduction: Effect of oral glucose ingestion. *J Endocrinol Invest*, 2011; 34(2): 117-123.
- Marty N, Dallaporta M, Foretz M, Emery M, Tarussio D, Bady I, Binnert C, Beermann F, Thorens B. Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *J Clin Invest*, 2005; 115: 3545-3553.
- Marty N, Dallaporta M, Thorens B. Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology* (Bethesda), 2007; 22: 241-251.
- Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett*, 2006; 580: 2917-2921.
- Maughan RJ, Fallah J, Coyle EF. The effects of fasting on metabolism and performance. *Br J Sports Med*, 2010; 44: 490-494.
- McCall AL, Van Bueren AM, Moholt-Siebert M, Cherry NJ, Woodward WR. Immunohistochemical localization of the neuron-specific glucose transporter (GLUT3) to neuropil in adult rat brain. *Brain Res*, 1994; 659: 292-297.
- McGowan KM, Long SD, Pekala PH. Glucose transporter gene expression: regulation of transcription and mRNA stability. *Pharmacol Ther*, 1995; 66: 465-505.
- McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol*, 1997; 11(4): 415-423.
- McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity and programming. *Physiol Rev*, 2005; 85: 571-633.
- McVie-Wylie AJ, Lamson DR, Chen YT. Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics*, 2001; 72: 113-117.
- Medina JM, Giaume C, Taberero A. Metabolic coupling and the role played by astrocytes in energy distribution and homeostasis. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology The function of glial cells in health and disease: Dialogue between glia and neurons*, 1999; 468: 361-371.
- Medina-Bravo P, Meza-Santibáñez R, Rosas-Fernández P, Galván-Duarte R, Saucedo-García R, Velázquez-López L, Torres-Tamayo M. Decrease in serum adiponectin levels associated with visceral fat accumulation independent of pubertal stage in children and adolescents. *Arch Med Res*, 2011; 42(2): 115-121.
- 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.
- Merrall NW, Plevin RJ, Gould GW. Growth factors, mitogens, oncogenes and the regulation of glucose transport. *Cell Signal*, 1993; 5: 667-675.

- Michaels CC, Holtzman SG. Enhanced sensitivity to naltrexone-induced drinking suppression of fluid intake and sucrose consumption in maternally separated rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2007; 86: 784-796.
- Millington GW. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr Metab (Lond)*, 2007; 4: 18.
- Mockus I. Leptina: Regulación y Asociaciones en la Obesidad. *Salud UIS* 2001; 33: 84-89.
- Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Newlander K. Design, synthesis, and biological activity of peptides which release growth hormone *in vitro*. *Endocrinology*, 1981; 108: 31-39.
- Montague CT, Prins JB, Sanders L, Digby JE, O'Rahilly S. Depotand sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes*, 1997; 46: 342-347.
- Moon JM, Kim S, Hwang L, Park S. Ghrelin regulates hippocampal neurogenesis in adult mice. *Endocr J*, 2009; 56(3): 525-531.
- Moschos S, Chan JL, Mantzoros CHS. Leptin and reproduction: a review. *Fertil and Steril*, 2002; 77: 433-443.
- Muccioli G, Pons N, Ghè C, Catapano F, Granata R, Ghigo E. Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol*, 2004; 498(1-3): 27-35.
- Muccioli G, Baragli A, Granata R, Papotti M, Ghigo E. Heterogeneity of ghrelin/growth hormone secretagogue receptors. Toward the understanding of the molecular identity of novel ghrelin/GHS receptors. *Neuroendocrinology*, 2007; 86(3): 147-164.
- 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. Review.
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*, 1985; 229: 941-945.
- Mühlhäusler BS, Adam CL, McMillen IC. Maternal nutrition and the programming of obesity. *Organogenesis*, 2008; 4: 144-152.
- Myers MG, Munzberg H, Leininger GM, Leshan RL. The Geometry of Leptin Action in the Brain: More Complicated Than a Simple ARC. *Cell Metab*, 2009; 9: 117-123.
- Nagamatsu S, Kornhauser JM, Burant CF, Seino S, Mayo KE, Bell GI. Glucose transporter expression in brain. *J Biol Chem*, 1992; 267: 467-472.
- Nagamatsu S, Sawa H, Kamada K, Nakamichi Y, Yoshimoto K, Hoshino T. Neuron-specific glucose transporter (NSGT): CNS distribution of GLUT3 rat glucose transporter (RGT3) in rat central neurons. *FEBS Lett*, 1993; 334: 289-295.
- Nakagawa E, Nagaya N, Okumura H, Enomoto M, Oya H, Ono F, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Hyperglycaemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth-hormone-releasing-peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose. *Clin Sci (Lond)*, 2002; 103(3): 325-328.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 2001; 409: 194-198.
- Netto CB, Conte S, Leite MC, Pires C, Martins TL, Vidal P, Benfato MS, Giugliani R, Gonçalves CA. Serum S100B protein is increased in fasting rats. *Arch Med Res*, 2006; 37(5): 683-686.

- Ngarmukos C, Bauer EL, Kumagai AK. Co-localization of GLUT1 and GLUT4 in the blood-brain barrier of the rat ventromedial hypothalamus. *Brain Res*, 2001; 900:1–8.
- Nishi Y, Hiejima H, Mifune H, Sato T, Kangawa K, Kojima M. Developmental changes in the pattern of ghrelin's acyl modification and the levels of acyl-modified ghrelin in murine stomach. *Endocrinology*, 2005; 146(6): 2709-2715.
- Nogueiras R, Tovar S, Mitchell SE, Rayner DV, Archer ZA, Dieguez C, Williams LM. Regulation of growth hormone secretagogue receptor gene expression in the arcuate nuclei of the rat by leptin and ghrelin. *Diabetes*, 2004; 53: 2552-2558.
- Novak CM, Kotz CM, Levine JA. Central orexin sensitivity, physical activity, and obesity in diet-induced obese and diet-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006; 290(2): 396-403.
- Oliva ME, Selenscig D, D'Alessandro ME, Chicco A, Lombardo YB. Soya protein ameliorates the metabolic abnormalities of dysfunctional adipose tissue of dyslipidaemic rats fed a sucrose-rich diet. *Br J Nutr*, 2011; 105(8): 1188-1198.
- Olney JW. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 1969; 164(880): 719-721.
- Olson CM, Strawderman MS, Dennison BA. Maternal weight gain during pregnancy and child weight at age 3 years. *Matern Child Health J*, 2009; 13: 839-846.
- O'Malley D, MacDonald N, Mizielinska S, Connolly CN, Irving AJ, Harvey J. Leptin promotes rapid dynamic changes in hippocampal dendritic morphology. *Mol Cell Neurosci*, 2007; 35(4): 559-572.
- Oreffo RO, Lashbrooke B, Roach HI, Clarke NM, Cooper C. Maternal protein deficiency affects mesenchymal stem cell activity in the developing offspring. *Bone*, 2003; 33(1): 100-107.
- Ozawa S. Role of glutamate transporter in excitatory synapses in cerebellar Purkinje cells. *Brain*, 2007; 130(7): 669-676.
- Pacifico L, Poggiogalle E, Costantino F, Anania C, Ferraro F, Chiarelli F, Chiesa C. Acylated and nonacylated ghrelin levels and their associations with insulin resistance in obese and normal weight children with metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol*, 2009; 161(6): 861-870.
- Pan W, Hsueh H, He Y, Sakharkar A, Cain C, Yu C, Kastin AJ. Astrocyte Leptin Receptor (ObR) and Leptin Transport in Adult-Onset Obese Mice. *Endocrinology*, 2008; 149(6): 2798-2806.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell*, 2006; 125: 775-784.
- Passos MC, Vicente LL, Lisboa PC, de Moura EG. Absence of anorectic effect to acute peripheral leptin treatment in adult rats whose mothers were malnourished during lactation. *Horm Metab Res*, 2004; 36(9): 625-629.
- Patel AD, Stanley SA, Murphy KG, Frost GS, Gardiner JV, Kent AS, White NE, Ghatei MA, Bloom SR. Ghrelin stimulates insulin-induced glucose uptake in adipocytes. *Regul Pept*, 2006; 134: 17-22.
- Patel MS, Srinivasan M, Laychock SG. Metabolic programming: Role of nutrition in the immediate postnatal life. *J Inherit Metab Dis*, 2009; 32: 218-228.
- Patel MS, Srinivasan M. Metabolic programming due to alterations in nutrition in the immediate postnatal period. *J Nutr*, 2010; 140(3): 658-61.
- Pawlak J, Brito V, Kuppens E, Beyer C. Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen. *BrainRes Mol Brain Res*, 2005; 138: 1-7.

- Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Second Edition. New York: Academic Press, 1986.
- Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91(22): 10625-10629.
- Pellerin L. Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. *Neurochem Int*, 2003; 43: 331-338.
- Pellerin L. How astrocytes feed hungry neurons. *Molecular Neurobiology*, 2005; 32: 59-68.
- Penicaud L, Leloup C, Lorsignol A, Alquier T, Guillod E. Brain glucose sensing mechanism and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2002; 5: 539-543.
- Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*, 2009; 32: 421-431.
- Pereira RO, Moreira AS, de Carvalho L, Moura AS. Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signaling cascade in rats' hearts. *Regul Pept*, 2006; 136 (1-3): 117-121.
- Pereira-Toste F, Toste FP, Oliveira E, Trotta PA, Lisboa PC, de Moura EG, Passos MC. Early maternal hyperleptinemia programs adipogenic phenotype in rats. *Horm Metab Res*, 2009; 41 (12): 874-879.
- Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart JC, Fievet C, Gonzalez FJ, Auwerx J. Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor α -deficient mice. *J Biol Chem*, 1997; 272: 27307-27312.
- Philippi M, Vyklicky L, Orkand RK. Potassium currents in cultured glia of the frog optic nerve. *Glia*, 1996; 17: 72-82.
- 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.
- 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*, 1999a; 21: 58-67.
- Plagemann A, Harder T, Rake A, Voits M, Fink H, Rohde W, Dorner G. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome X-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res*, 1999b; 836: 146-155.
- Plagemann A, Harder T, Rake A, Melchior K, Rohde W, Dörner G. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutr*, 2000; 130(10): 2582-2589.
- Plagemann A. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Horm Res*, 2006a; 65(3): 83-89.
- Plagemann A. Early life determinants of adult health and diseases. *J Perinat Med*, 2006b; 34: 256-257.
- Ponzo OJ, Reynoso R, Rondina D, Szwarcfarb B, Carbone S, Scacchi P, Moguilevsky JA. Effect of leptin on LH levels and hypothalamic release of GnRH. Its relationship with the hypothalamic neurotransmitter amino acids system in adult male rats. *Endocr Res*, 2004; 30(2): 179-187.
- Ponzo OJ, Reynoso R, Rimoldi G, Rondina D, Szwarcfarb B, Carbone S, Scacchi P, Moguilevsky JA. Leptin stimulates the reproductive male axis in rats during sexual maturation by acting on hypothalamic excitatory amino acids. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2005; 113(3): 135-138.
- Pöykkö SM, Kellokoski E, Hörkkö S, Kauma H, Kesäniemi YA, Ukkola O. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes*, 2003; 52 (10): 2546-2553.

Prader A, Tanner JM, von Harnack G. Catch-up growth following illness or starvation. An example of developmental canalization in man. *J Pediatr*, 1963; 62: 646-659.

Prinz RJ, Roberts WA, Hantman E. Dietary correlates of hyperactive behavior in children. *J Consult Clin Psychol*, 1980; 48(6):760-769.

Qader SS, Salehi A, Hakanson R, Lundquist I, Ekelund M. Long-term infusion of nutrients (total parenteral nutrition) suppresses circulating ghrelin in food-deprived rats. *Regul Pept*, 2005; 131(1-3): 82-88.

Qader SS, Håkanson R, Rehfeld JF, Lundquist I, Salehi A. Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: a study on isolated islets from mouse and rat pancreas. *Regul Pept*, 2008; 146(1-3): 230-237.

Raben A, Vasilaras TH, Moller AC, Astrup A. Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 weeks supplementation in overweight subjects. *Am J Clin Nutr*, 2002; 76: 721-729.

Raj M, Kumar RK. Obesity in children & adolescents. *Indian J Med Res*, 2010; 132(5): 598-607.

Rajkumar K, Modric T, Murphy LJ. Impaired adipogenesis in insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice. *J Endocrinol*, 1999; 162: 457-465.

Rasmussen JE, Torres-Aleman I, MacLusky NJ, Naftolin F, Robbins RJ. The effects of estradiol on the growth patterns of estrogen receptor-positive hypothalamic cell lines. *Endocrinology*, 1990; 126(1): 235-240.

Rayner DV, Thomas ME, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUTs 1-4) and their mRNAs in regions of the rat brain: insulin-sensitive transporter expression in the cerebellum. *Can J Physiol Pharmacol*, 1994; 72: 476-479.

Reilly MP, Rader DJ. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation*, 2003; 108(13): 1546-1551.

Reimer MK, Pacini G, Ahren B. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 2003; 144: 916-921.

Reiss NA. Ontogeny and estrogen responsiveness of creatine kinase and glycolytic enzymes in brain and uterus of rat. *Neurosci Lett*, 1988; 84(2): 197-202.

Remmers F, Fodor M, Delemarre-van de Waal HA. Neonatal food restriction alters rat body dimensions and energy intake. *Physiol Behav*, 2008; 95: 208-215.

Reynoso R, Ponzio OJ, Szwarcfarb B, Rondina D, Carbone S, Rimoldi G, Scacchi P, Moguilevsky JA. Effect of leptin on hypothalamic release of GnRH and neurotransmitter amino acids during sexual maturation in female rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2003; 111(5): 274-277.

Rodrigues AL, De Souza EP, Da Silva SV, Rodrigues DS, Nascimento AB, Barja-Fidalgo C, De Freitas MS. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *J Endocrinol*, 2007; 195(3): 485-494.

Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MC, Trenzoli 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):109-117.

Rogers S, Macheda ML, Docherty SE, Carty MD, Henderson MA, Soeller WC, Gibbs EM, James DE, Best JD. Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *American Journal of Physiology*, 2002; 282: 733-738.

- Rolland C, Hession M, Broom I. Effect of weight loss on adipokine levels in obese patients. 2011; 4:315-323.
- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, 1994; 13:713-725.
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science*, 2008; 322: 1551-1555.
- Sabath EF. Leptina. *Rev Invest Clin*, 2002; 54: 161-165.
- Saenger P, Czernichow P, Hughes I, Reiter EO. Small for gestational age: short stature and beyond. *Endocr Rev*, 2007; 28: 219-251.
- Salehi A, Dornonville de la Cour C, Håkanson R, Lundquist I. Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. *Regul Pept*, 2004; 118(3): 143-150.
- Sant'Anna G, Mortola JP. Inter-organ unevenness and catch-up growth in rats. *Growth Dev Aging*, 2003; 67(1): 27-46.
- Sasaki T, Kitamura T. Roles of FoxO1 and Sirt1 in the central regulation of food intake. *Endocrinology Journal*, 2010; 57(11): 939-946.
- Sato T, Fukue Y, Teranishi H, Yoshida Y, Kojima M. Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-d-glucose administration. *Endocrinology*, 2005; 146(6): 2510-2516.
- Schurr A. Lactate: The ultimate cerebral oxidative energy substrate? *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006; 26: 142-152.
- Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kuijper JL, Foster D, Lasser G, Prunkard DE, Porte D Jr, Woods SC, Seeley RJ, Weigle DS. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*, 1996; 45: 531-535.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 2000; 404: 661-671.
- Sclafani A, Hertwig H, Vigorito M, Feigin MB. Sex differences in polysaccharide and sugar preferences in rats. *Neurosci Biobehav Rev*, 1987; 11: 241-251.
- Sclafani A. Oral and postoral determinants of food reward. *Physiol Behav*, 2004; 81: 773-779.
- Seifert G, Schilling K, Steinhauser C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci*, 2006; 7: 194-206.
- Serres S, Bouyer J, Bezancon E, Canioni P, Merle M. Involvement of brain lactate in neuronal metabolism. *NMR Biomed*, 2003; 16, 430-439.
- Serres S, Bezancon E, Franconi JM, Merle M. Ex vivo analysis of lactate and glucose metabolism in the rat brain under different states of depressed activity. *J Biol Chem*, 2004; 279: 47881-47889.
- 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.
- Sheludiakova A, Rooney K, Boakes RA. Metabolic and behavioural effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. *Eur J Nutr*, 2011. doi 10.1007/s00394-011-0228-x.
- Shiia T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002; 87: 240-244.

- Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuro peptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*, 2001; 50: 227-232.
- Siesjö BK. Brain metabolism and anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*, 1978; 70: 56-59.
- Simpson IA, Appel NM, Hokari M, Oki J, Holman GD, Maher F, Koehler-Stec EM, Vannucci SJ, Smith QR. Blood-brain barrier glucose transporter: effects of hypo- and hyperglycemia revisited. *J Neurochem*, 1999; 72: 238-247.
- Simpson KA, Martin NM, Bloom SR. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2009; 53(2): 120-128. Review.
- Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007; 92: 1023-1033.
- Song Z, Levin BE, McArdle JJ, Bakhos N, Routh VH. Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes*, 2001; 50: 2673-2681.
- Soria A, D'Álessandro ME, Lomardo YB. Duration of feeding on a sucrose-rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes. *J Appl Physiol*, 2001; 91: 2109-2116.
- Soriano-Guillén L, Barrios V, Campos-Barros A, Argente J. Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J Pediatr*, 2004; 144(1): 36-42.
- Spiegel K, Tasali E, Leproult R, Scherberg N, Van Cauter E. Twenty-four-hour profiles of acylated and total ghrelin: relationship with glucose levels and impact of time of day and sleep. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010; 96: 486-493.
- Spinedi E, Gaillard RC. A regulatory loop between the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis and circulating leptin: a physiological role of ACTH. *Endocrinology*, 1998; 139: 4016-4020.
- Srinivasan M, Mitrani P, Sadhanandan G, Dodds C, Shbeir-EIDika S, Thamotharan S, Ghanim H, Dandona P, Devaskar SU, Patel MS. A highcarbohydrate diet in the immediate postnatal life of rats induces adaptations predisposing to adult-onset obesity. *J Endocrinol*, 2008; 197: 565-574.
- Stanhope KL, Havel PJ. Endocrine and metabolic effects of consuming beverages sweetened with fructose, glucose, sucrose, or high-fructose corn syrup. *Am J clin Nutr*, 2008; 88(suppl): 1733-1737.
- Stevens B. Neuron-astrocyte signaling in the development and plasticity of neural circuits. *Neurosignals*, 2008; 16: 278-288.
- Stolarczyk E, Guissard C, Michau A, Even PC, Grosfeld A, Serradas P, Lorsignol A, Pénicaud L, Brot-Laroche E, Leturque A, Le Gall M. Detection of extracellular glucose by GLUT2 contributes to hypothalamic control of food intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010; 298: E1078-E1087.
- Stuart CA, Wen G, Jiang J. GLUT3 protein and mRNA in autopsy muscle specimens. *Metabolism*, 1999; 48: 876-880.
- Stuebe AM, Forman MR, Michels KB. Maternal-recalled gestational weight gain, prepregnancy body mass index, and obesity in the daughter. *Int J Obes (Lond)*, 2009; 33: 743-752.
- Sun Y, Asnicar M, Smith RG. Central and peripheral roles of ghrelin on glucose homeostasis. *Neuroendocrinology*, 2007; 86: 215-228.
- Symonds ME, Sebert SP, Hyatt MA, Budge H. Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nat Rev Endocrinol*, 2009; 5: 604-610.

- Tan HY, Rand JS, Morton JM, Fleeman LM, Armstrong PJ, Coradini M, Ishioka K, Verkest KR, Richards AA, Rawlings JM, Rose FJ, Whitehead JP. Adiponectin profiles are affected by chronic and acute changes in carbohydrate intake in healthy cats. *Gen Comp Endocrinol*, 2011; 172(3): 468-474.
- Tanaka M, Hayashida Y, Iguchi T, Nakao N, Nakai N, Nakashima K. Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. *Endocrinology*, 2001; 142(8): 3697-3700.
- Tang-Christensen M, Vrang N, Ortmann S, Bidlingmaier M, Horvath TL, Tschöp M. Central administration of ghrelin and agouti-related protein (83-132) increases food intake and decreases spontaneous locomotor activity in rats. *Endocrinology*, 2004; 145(10): 4645-4652.
- Tannenbaum GS, Lapointe M, Beaudet A, Howard AD. Expression of growth hormone secretagogue receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology*, 1998; 139: 4420-4423.
- Tanner JM. Growth as a target-seeking function; catchup and catch-down growth in man. In: *Falkner F, Tanner JM, editors. Human Growth. A Comprehensive Treatise. New York: Plenum Press, 1986; 2: 171-209.*
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 1995; 83: 1263-1271.
- Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem*, 1997; 272: 6093-6096.
- Thalmann S, Meier CA. Local adipose tissue depots as cardiovascular risk factors. *Cardiovasc Res*, 2007; 75(4): 690-701.
- Theander-Carrillo C, Wiedmer P, Cettour-Rose O. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, 2006; 116(7): 1983-1993.
- Theodosis DT, Poulain DA, Olié SH. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev*, 2008; 88(3): 983-1008. Review.
- Thompson NM, Gill DA, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson IC, Wells T. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly *in vivo* by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*, 2004; 145: 234-242.
- Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell*, 1988; 55: 281-290.
- Thorens B. Molecular and cellular physiology of GLUT2, a high-K_m facilitated diffusion glucose transporter. *Int Rev Cytol*, 1992; 137A: 209-238.
- Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010; 298: 141-145.
- Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan LL, Wand QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kanagawa K, Nakazato M. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology*, 2003; 144: 1506-1512.
- Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG, Yamanaka A, Sakurai T, Date Y, Mondal MS, Shimbara T, Kawagoe T, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Nakazato M. Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*, 2006; 147(5): 2306-2314.
- Tsacopoulos M, Magistretti P. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci*, 1996; 16: 877-885.

- Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 2000; 407: 908-913.
- Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, 2001; 50: 707-709.
- Turer AT, Khera A, Ayers CR, Turer CB, Grundy SM, Vega GL, Scherer PE. Adipose tissue mass and location affect circulating adiponectin levels. *Diabetologia*, 2011; 54(10): 2515-24.
- Udagawa J, Hashimoto R, Suzuki H, Hatta T, Sotomaru Y, Hioki K, Kagohashi Y, Nomura T, Minami Y, Otani H. The role of leptin in the development of the cerebral cortex in mouse embryos. *Endocrinology*, 2006; 147(2): 647-658.
- Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD, Chatton JY, Riederer BM, Thorens B. Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J*, 2001; 20: 4467-4477.
- Uldry M, Ibberson M, Hosokawa M, Thorens B. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett*, 2002; 524: 199-203.
- Uldry M, Thorens B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflügers Arch*, 2004; 447: 480-489.
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. Control of synapse number by glia. *Science*, 2001; 291: 657-661.
- Ulrich-Lai YM, Christiansen AM, Ostrander MM, Jones AA, Jones KR, Choi DC, Krause EG, Evanson NK, Furay AR, Davis JF, Solomon MB, de Kloet AD, Tamashiro KL, Sakai RR, Seeley RJ, Woods SC, Herman JP. Pleasurable behaviors reduce stress via brain reward pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; 107(47): 20529-34.
- Uyama N, Geerts A, Reynaert H. Neural connections between the hypothalamus and the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2004; 280(1): 808-820. Review.
- Van Eldik LJ, Wainwright MS. The janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*, 2003; 21: 97-108.
- Van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev*, 2004; 25(3): 426-457.
- Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thorne A, Hoffstedt J, Lonnqvist F, Arner P. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes*, 1998; 47: 913-917.
- Vannucci SJ, Seaman LB, Vannucci RC. Effects of hypoxia-ischemia on GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in immature rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996; 16(1): 77-81.
- Vázquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res*, 2008; 39(8): 715-728. Review.
- Vega-Agapito V, Almeida A, Hatzoglou M, Bolaños JP. Peroxynitrite stimulates L-arginine transport system y(+) in glial cells. A potential mechanism for replenishing neuronal L-arginine. *J Biol Chem*, 2002; 277: 29753-29759.
- Velkoska E, Cole TJ, Morris MJ. Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005; 288: E1236-1243.
- Vickers MH, Gluckman PD, Conveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH, Harris M. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology*, 2005; 146: 4211-4216.

- Vickers MH, Gluckman PD, Convey 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.
- Vital P, Larrieta E, Hiriart M. Sexual dimorphism in insulin sensitivity and susceptibility to develop diabetes in rats. *J Endocrinol*, 2006; 190: 425-432.
- Volterra A, Steinhäuser C. Glial modulation of synaptic transmission in the hippocampus. *Glia*, 2004; 47: 249-257.
- Wang L, Saint-Pierre DH, Tache Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuro peptide Y-synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett*, 2002; 325: 47-51.
- Wang R, Liu X, Dunn-Meynell A, Levin BE, Routh VH. The regulation of glucose-excited (GE) neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes*, 2004; 53:1959-1965.
- Watt MJ, Spriet LL. Triacylglycerol lipases and metabolic control: implications for health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010; 299(2): E162-168.
- Weisová P, Concannon CG, Devocelle M, Prehn JH, Ward MW. Regulation of glucose transporter 3 surface expression by the AMP-activated protein kinase mediates tolerance to glutamate excitation in neurons. *J Neurosci*, 2009; 29(9): 2997-3008.
- Weiss R. Impaired glucose tolerance and risk factors for progression to type 2 diabetes in youth. *Pediatr Diabetes*, 2007; 8 Suppl 9: 70-75. Review.
- Wells JCK, Chomtho S, Fewtrell MS. Programming of body composition by early growth and nutrition. *Proc Soc Nutr*, 2007; 66: 4232-4234.
- Widdas WF. Inability of diffusion to account for placental glucose transfer in the sheep and consideration of the kinetics of a possible carrier transfer. *J Physiol*, 1952; 118: 23-39.
- Willesen MG, Kristensen P, Romer J. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuatenucleus of the rat. *Neuroendocrinology*, 1999; 70: 306-316.
- Williams DL, Cummings DE, Grill HJ, Kaplan JM. Meal-related ghrelin suppression requires postgastric feedback. *Endocrinology*, 2003; 144(7): 2765-2767.
- Williams J, Mobarhan S. A critical interaction: leptin and ghrelin. *Nutr Rev*, 2003; 61: 391-393.
- Williams JPG, Tanner JM, Hughes PCR. Catch-up growth in male rats after growth retardation during the suckling period. *Pediatr Res*, 1974a; 8: 149-156.
- Williams JPG, Tanner JM, Hughes PCR. Catch-up growth in female rats after growth retardation during the suckling period: comparison with males. *Pediatr Res*, 1974b; 8:157-162.
- Williams KW, Margatho LO, Lee CE, Choi M, Lee S, Scott MM, Elias CF, Elmquist JK. Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. *J Neurosci*, 2010; 30(7): 2472-2479.
- Wilson MR, Hughes SJ. The effect of maternal protein deficiency during pregnancy and lactation on glucose tolerance and pancreatic islet function in adult rat offspring. *J. Endocrinology*, 1997; 154: 177-185.
- Wilson PN, Osbourn DF. Compensatory growth after undernutrition in mammals and birds. *Biol Rev*, 1960; 35: 324-361.

- Wood S, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition*, 2003; 89: 3-9.
- Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, 2000; 141: 4325-4328.
- Wu X, Li W, Sharma V, Godzik A, Freeze HH. Cloning and characterization of glucose transporter 11, a novel sugar transporter that is alternatively spliced in various tissues. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2002; 76: 37-45.
- Yada T, Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Damdindorj B, Nakata M, Kakei M. Ghrelin regulates insulin release and glycemia physiological role and therapeutic potential. *Curr Diabetes Rev*, 2008; 4:18-23.
- Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*, 2008; 132 (3): 387-396.
- Yanovski S. Sugar and Fat: Cravings and Aversions. *J Nutr*, 2003; 133: 835-837.
- Yi CX, Habegger KM, Chowen JA, Stern J, Tschöp MH. A role for astrocytes in the central control of metabolism. *Neuroendocrinology*, 2011; 93(3): 143-149.
- Yi JH, Hazell AS. Excitotoxic mechanism and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem Int*, 2006; 48(5): 394-403.
- Zhang W, Hu Y, Lin TR, Fan Y, Mulholland MW. Stimulation of neurogenesis in rat nucleus of the solitary tract by ghrelin. *Peptides*, 2005; 26: 2280-2288.
- 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.
- Zhao TJ, Liang G, Li RL, Xie X, Sleeman MW, Murphy AJ, et al. Ghrelin O- acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; 107: 7467-7472.
- Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, 2006; 494:528-548.
- Zink M, Vollmayr B, Gebicke-Haerter PJ, Henn FA. Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. *Neuropharmacology*, 2010; 58(2): 465-473.