



FACULTAD DE FARMACIA  
ESCUELA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA

**“INFLUENCIA DEL SISTEMA ADRENÉRGICO EN EL DESARROLLO DE  
ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO EN LA  
DESCENDENCIA DE RATAS CON OBESIDAD GESTACIONAL”**

Tesis para optar al Grado Académico de Licenciado en Nutrición y Dietética  
y al Título de Nutricionista

JAVIERA BEATRIZ CORTEZ VILLA  
CAMILA ROJAS CISTERNAS

Director de Tesis: Gonzalo Cruz Neculpán PhD

Valparaíso, 2016.



*Dedico esta tesis a mi familia, especialmente a mi madre Carol y a mis tatas Pedro e Irene por su apoyo absoluto y entrega infinita. Por comprenderme en los momentos de mayor estrés y regalarme cuando más lo necesité. Gracias por brindarme la oportunidad de estudiar, permitir tomar mis propias decisiones, por enseñarme a perseverar y a confiar en mi misma.*

*Y a mi amiga y compañera de tesis Camila Rojas por su paciencia, comprensión e incondicionalidad desde el primer año de nuestra carrera hasta el día de hoy. Junto a Camila Vera le dieron sentido y calidez a estos cinco años de universidad. Gracias por ser parte de los pilares que me sostuvieron en el momento más difícil. De esta experiencia fueron lo mejor.*

*Javiera*

*A mis padres, Ruth y Rigoberto, por estar presentes no solo en esta etapa de mi vida, sino en todo momento. Por su apoyo, contención emocional, comprensión ante las ausencias, por creer en mí y mis capacidades durante todo este periodo.*

*A Javiera por haber sido una buena amiga y compañera de tesis, por motivarme a seguir adelante y haber sido capaz de sacar más de una carcajada en momentos de desesperación.*

*Camila*

## **Agradecimientos**

*A Karina, Isabella y Daniela por el tiempo y ayuda desinteresada que nos otorgaron. Por introducirnos al manejo del laboratorio y las técnicas experimentales, además de facilitar el trabajo en equipo y el compañerismo.*

*Agradecemos también al equipo del Laboratorio de Neuroquímica y Neurofarmacología del Dr. Ramón Sotomayor Zárate, por su colaboración y siempre buena disposición.*

*Y con el más profundo respeto y admiración agradecemos a nuestro director de tesis Gonzalo Cruz Neculpán por la confianza depositada en nosotras, además de su tiempo y dedicación. Por respetar y no limitar nuestros procesos de aprendizaje. Por entender y practicar el sarcasmo como nuestro medio de comunicación y por respetar nuestros ataques de risa en los momentos de mayor ansiedad. Gracias por abrirnos las puertas para acercarnos al mundo de la investigación y darnos la oportunidad de trabajar colaborativamente con su equipo.*

## Índice

<b>Resumen</b> .....	7
<b>Abstract</b> .....	8
<b>Introducción</b> .....	10
Consecuencias de la obesidad gestacional sobre la función hepática en la descendencia	11
Mecanismos de la disfunción hepática asociada a hígado graso no alcohólico .....	12
Papel del sistema nervioso simpático en el desarrollo de EHGNA y su relación con leptina .....	13
<b>Hipótesis</b> .....	18
<b>Objetivo General</b> .....	19
<b>Objetivos Específicos</b> .....	19
<b>Materiales y métodos</b> .....	20
Tipo de estudio .....	20
Animales.....	20
Determinación de leptina sérica por Inmuno-ensayo ligado a enzima (ELISA).....	23
Semi-cuantificación de la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa en hígado por Western Blot.....	23
Detección de noradrenalina por Inmuno-ensayo ligado a enzima (ELISA).....	24
Determinación de la concentración de proteínas en hígado .....	24
Determinación de la expresión de glucoquinasa, glucógeno fosforilasa y acetil coenzima A carboxilasa en hígado por RT- PCR en tiempo real .....	24
Análisis Estadístico .....	26
<b>Resultados</b> .....	27
Peso corporal .....	27

Niveles de glucosa sérica.....	27
Niveles de leptina sérica.....	28
Niveles de noradrenalina en hígado .....	29
Expresión de tirosina hidroxilasa en hígado.....	30
Expresión de glucógeno fosforilasa en hígado .....	32
Expresión de Acetil CoA carboxilasa en hígado .....	32
Expresión de glucoquinasa hepática.....	33
<b>Discusión</b> .....	<b>35</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>40</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>41</b>

## Resumen

La prevalencia de obesidad en Chile es cada vez mayor, lo que se traduce en un 59% de mujeres embarazadas con exceso de peso. Tanto en humanos como en animales de experimentación la obesidad gestacional se relaciona con consecuencias metabólicas en la descendencia, como hipertensión arterial, obesidad e intolerancia a la glucosa, entre otras. Estudios realizados por nuestro laboratorio han demostrado que la descendencia femenina de ratas con obesidad inducida por una dieta alta en grasas, presenta enfermedad de hígado graso no alcohólico, además de otras alteraciones metabólicas. En base a esto y con el fin de dilucidar el rol del sistema nervioso simpático en el desarrollo de enfermedad hepática, proponemos que la obesidad materna durante la etapa pregestacional, preñez y lactancia en ratas programa un aumento en la estimulación nerviosa simpática a nivel hepático en la descendencia, lo que modula la expresión de enzimas claves en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, conduciendo al desarrollo de enfermedad de hígado graso no alcohólico. Utilizamos la descendencia de ratas de la cepa Sprague-Dawley sometidas a dieta control o alta en grasa. Analizamos el peso corporal, los niveles de glucosa y leptina sérica, los niveles de noradrenalina, la expresión de tirosina hidroxilasa, glucógeno fosforilasa, glucoquinasa y acetil coa carboxilasa en hígado. En la descendencia de madres con dieta alta en grasa, tirosina hidroxilasa se encuentra disminuida, mientras que noradrenalina y las enzimas glucógeno fosforilasa y acetil coa carboxilasa se encuentran aumentadas. Las alteraciones del sistema nervioso simpático en hígado demostradas en nuestro estudio estarían modulando la expresión de glucógeno fosforilasa, lo que contribuye al desarrollo de hígado graso no alcohólico. Sin embargo, creemos que el rol del sistema adrenérgico en el desarrollo de esta enfermedad debe ser mejor dilucidado.

## Abstract

### **Influence of the adrenergic system in the development of non-alcoholic fatty liver disease in the offspring of rats with gestational obesity**

The prevalence of obesity in Chile becomes higher every time, which implies a 59% of pregnant women with excess weight. In both humans and experimental animals, gestational obesity is related to metabolic consequences in offspring, such as hypertension, obesity and glucose intolerance, among others.

Studies conducted by our laboratory have demonstrated that female offspring of rats with obesity induced by a diet high in fat, have a tendency for having non-alcoholic fatty liver disease, in addition to other metabolic alterations. Based on this and in order to elucidate the role of the sympathetic nervous system in the development of liver disease, we propose that maternal obesity during the pre-gestational stage, pregnancy and lactation in rats result in an increase of sympathetic nervous stimulation at the hepatic level in the offspring, which modulate the expression of key enzymes in the metabolism of lipids and carbohydrates, leading to the development of nonalcoholic fatty liver disease.

For the purpose of this research, we used the offspring of rats of the Sprague-Dawley strain under control or high fat diet. We analyzed body weight, serum glucose and leptin levels, noradrenaline levels, tyrosine hydroxylase expression, glycogen phosphorylase, glucokinase and acetyl coa carboxylase in liver. In the offspring of mothers with a high-fat diet, tyrosine hydroxylase is decreased, while norepinephrine and glycogen phosphorylase and acetyl coa carboxylase enzymes are found to be increased. Alterations of the sympathetic nervous system in liver demonstrated in our study would be modulating the

expression of glycogen phosphorylase, which contributes to the development of non-alcoholic fatty liver. However, we believe that the role of the adrenergic system in the development of this disease should be better elucidated.

## **Introducción**

La malnutrición por exceso, ya sea sobrepeso u obesidad, se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (1).

A nivel mundial, la prevalencia de obesidad casi se ha duplicado desde 1980 al 2014. De acuerdo a cifras entregadas por la Organización Mundial de la Salud el año 2014, alrededor del 52% de la población de 18 años o más presenta exceso de peso, de la cual el 39% tenía sobrepeso (38% hombres y 40% mujeres), mientras que el 13% presentaba obesidad (un 11% hombres y 15% mujeres) (1) (2). A nivel nacional, de acuerdo a cifras entregadas por la Encuesta Nacional de Salud del año 2010, el 67% de la población entre 15 y 64 años tenía exceso de peso corporal, con una prevalencia de 39% de sobrepeso, 25% de obesidad (19,2% en los hombres y 30,7% en las mujeres) y 2,3% de obesidad mórbida (3).

Además, según cifras entregadas por National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), el 31,9% de las mujeres entre 20 y 39 años, residentes en Estados Unidos son obesas, datos que son extrapolables a nivel mundial por la diversidad de la muestra que contempló el estudio (4). En Chile el panorama es similar, pues para el año 2010 el 51% de las mujeres en edad fértil (15 a 44 años) presentaba sobrepeso u obesidad, situación que persiste durante el embarazo (5). Al año 2013 el 59% de las mujeres embarazadas que se controlaban en establecimientos del Sistema Nacional de Servicios de Salud (SNSS) presentaban malnutrición por exceso (6).

## **Consecuencias de la obesidad gestacional sobre la función hepática en la descendencia**

El embarazo es uno de los periodos de mayor vulnerabilidad nutricional debido a factores tanto fisiológicos como culturales (7). La obesidad materna durante el embarazo se asocia a diversas complicaciones como un mayor riesgo de preeclampsia, una mayor probabilidad de parto por cesárea, infecciones post parto y un aumento en la tasa de recién nacidos grandes para la edad gestacional (8).

Por otra parte, ante la exposición a diversos factores perjudiciales durante un periodo crítico o sensible del desarrollo, es posible que ocurran cambios a largo plazo en la fisiología del individuo en gestación, que pueden resultar en consecuencias negativas o adversas en la adultez. Este concepto se denomina “programming” o “reprogramación del desarrollo” (9). En este contexto existe una creciente evidencia tanto en animales de experimentación como en humanos, la cual sostiene que la malnutrición en el periodo gestacional y perinatal tiene un rol crucial en el desarrollo de enfermedades como obesidad, hipertensión arterial y diabetes mellitus tipo 2 en la adultez (10) (11).

Diversos estudios han demostrado que la descendencia de roedores con obesidad materna inducida mediante la administración de una dieta hipercalórica presenta hiperfagia, aumento de la adiposidad, hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa y gluconeogénesis hepática aumentada durante su vida postnatal (12) (13).

En el marco de las alteraciones hepáticas que se desarrollan en la descendencia de ratas obesas, se ha observado la presencia de esteatosis y un mayor peso del hígado en la adultez (14). Por otra parte, de acuerdo a un estudio realizado en primates en el que las hembras

fueron alimentadas con una dieta alta en grasa previo y durante la preñez, se observó que la descendencia presenta un aumento de triglicéridos hepáticos, lo que se correlaciona con la “Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico” (EHGNA) en la adultez (15). Además, de acuerdo a un estudio realizado en ratones se determinó que las crías de hembras con obesidad gestacional presentan una disfunción oxidativa en el hígado, junto a esteatosis hepática temprana, lo que contribuye a una lesión hepática en la adultez (16). Otro estudio con mayor seguimiento de la descendencia indica que las crías presentan lesión hepática, aumento del tono del sistema nervioso simpático (SNS) e inducción de la fibrogénesis a través de la activación de células estrelladas en hígado (17). En consecuencia, las crías de madres que tuvieron obesidad gestacional desarrollan alteraciones metabólicas, entre ellas enfermedad de hígado graso no alcohólico en la adultez.

### **Mecanismos de la disfunción hepática asociada a hígado graso no alcohólico**

El término “Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico” incluye alteraciones que van desde la esteatosis hasta la cirrosis e insuficiencia hepática (18). Es la enfermedad hepática crónica más común en los países occidentales y es considerada como la manifestación hepática del síndrome metabólico (19). En condiciones fisiológicas la grasa hepática no debe superar el 5% del peso total del órgano, pues cuando supera esta cantidad se presenta el llamado hígado graso, caso en el cual el contenido lipídico en el hígado llega a ser hasta del 25 al 30 % (20) (21). Existen numerosas situaciones clínicas que se han relacionado con EHGNA, como obesidad, diabetes mellitus e hiperlipidemia, entre otras (22). El

mecanismo patogénico se asocia con resistencia a la insulina y se explica con la teoría del “doble impacto” (23). En el “primer impacto” se produce disminución en la capacidad celular de responder a la acción de la insulina. En el tejido adiposo, producto de la resistencia a la insulina, se activa la lipasa sensible a hormona (LSH) favoreciendo la lipólisis y posterior liberación de ácidos grasos libres (AGL) al hígado, en donde aumenta la gluconeogénesis, disminuye la síntesis de glucógeno y aumenta la captación de los AGL, se altera el transporte de triglicéridos y de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL por sus siglas en inglés) e inhibe la beta-oxidación (23) (24). Además, en el músculo esquelético disminuye la absorción de glucosa, siendo el exceso de ésta captado por el hígado a través de GLUT-2, transportador independiente de insulina, quedando expuesto a una sobrecarga de glucosa intrahepática que se convierte en AGL y TG (25). Estas alteraciones en el metabolismo de las grasas son la base de la aparición de EHGNA.

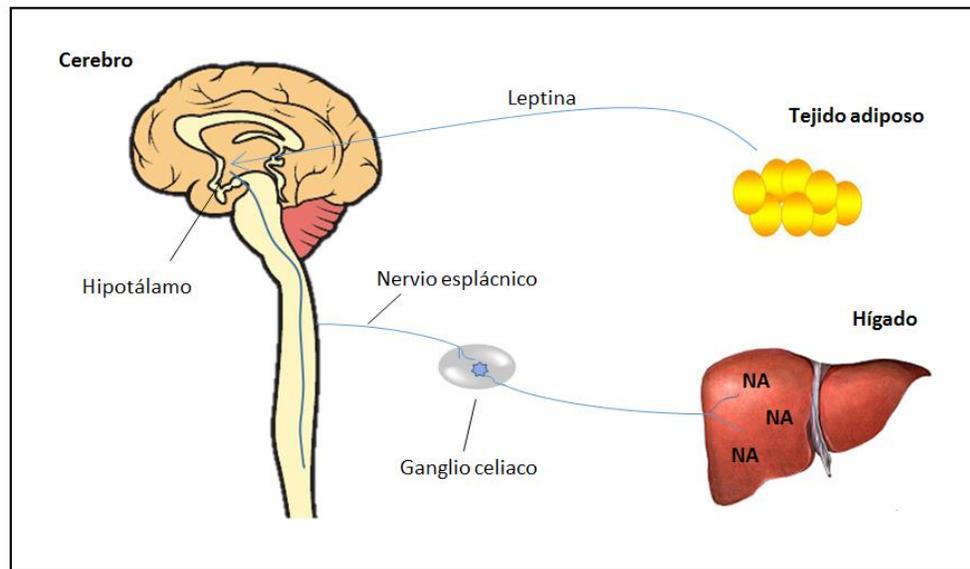
El “segundo impacto” es consecuencia del estrés oxidativo en hepatocitos debido a la sobrecarga de AGL, generando especies reactivas de oxígeno (ROS) que, mediante la activación de las células de kupffer, inducen la síntesis de factores pro-inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleuquina-8 (IL-8) (26).

### **Papel del sistema nervioso simpático en el desarrollo de EHGNA y su relación con leptina**

La leptina, hormona producida por el tejido adiposo, actúa a nivel cerebral y también se encarga de estimular la lipólisis. El efecto lipolítico está mediado por la capacidad de esta hormona de incrementar la actividad de las fibras nerviosas simpáticas que inervan el tejido

adiposo (27). Y está demostrado que la fosforilación de la lipasa sensible a hormona, encargada del desdoblamiento de los triglicéridos para su posterior paso a la circulación, se ve fuertemente incrementada en tejido adiposo en presencia de leptina (28). Se ha estudiado que las fibras nerviosas simpáticas establecen uniones neuro-adiposas, por lo que los adipocitos estarían en directo contacto con los nervios simpáticos, en donde la liberación de noradrenalina genera una respuesta lipolítica local y el agotamiento de la masa adiposa (28). En resumen, la activación de neuronas simpáticas conduciría a la liberación de catecolaminas, a través de la acción de leptina, lo que es necesario para estimular la fosforilación de la lipasa sensible a hormona en el tejido adiposo y con esto se genere lipólisis (28).

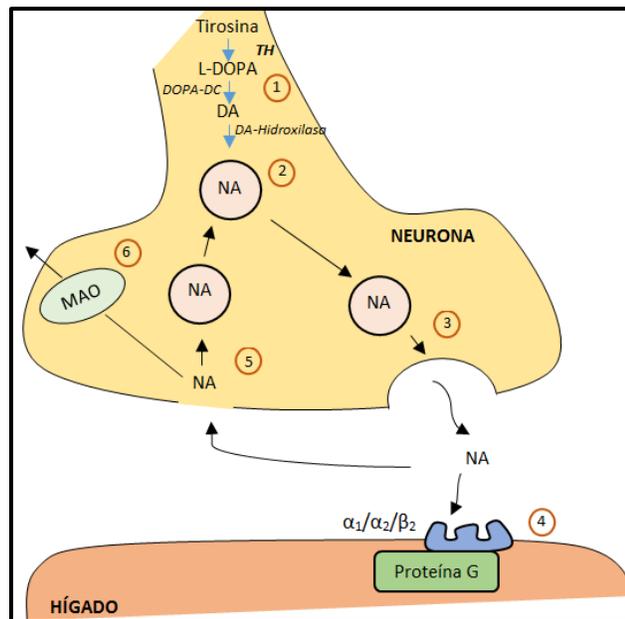
Por otra parte, existe evidencia en la que se ha observado el aumento de actividad nerviosa simpática a nivel hepático proveniente del nervio esplácnico y sus fibras postganglionares que se originan en los ganglios celíacos (29) (30) (Figura 1). Asimismo, se ha demostrado que el circuito neural hepático mediado por el SNS controla el metabolismo lipídico en hígado, ya que la denervación simpática selectiva de éste genera reducción en la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (31).



**Figura 1. Inervación simpática del hígado mediada por leptina.** La leptina es secretada desde el tejido adiposo, ejerciendo su acción a nivel hipotalámico donde nace el circuito neural que inerva el hígado, esto a través del nervio esplácnico y sus fibras postganglionares que se originan en el ganglio celiaco. *Elaboración propia.*

Las neuronas del sistema simpático se caracterizan por ser uno de los principales sitios en donde se producen las catecolaminas: dopamina, noradrenalina y adrenalina, importantes neurotransmisores derivados de la dihidroxifenilalanina (DOPA) (32) (33). Como se muestra en la figura 2, el primer paso de la biosíntesis de catecolaminas implica la conversión del aminoácido tirosina en DOPA por acción de la enzima tirosina hidroxilasa, la cual es la enzima limitante de la síntesis de catecolaminas. Posteriormente, a través de la acción de la enzima dopa-descarboxilasa, la DOPA se transforma en dopamina, la que es capturada por vesículas de almacenamiento, y por acción de la dopamina beta-hidroxilasa se transforma en noradrenalina para ser liberada al espacio sináptico en respuesta al estímulo nervioso. Aproximadamente el 95% de la NA liberada es recaptada al terminal presináptico para que una parte vuelva a las vesículas de almacenamiento, mientras otra

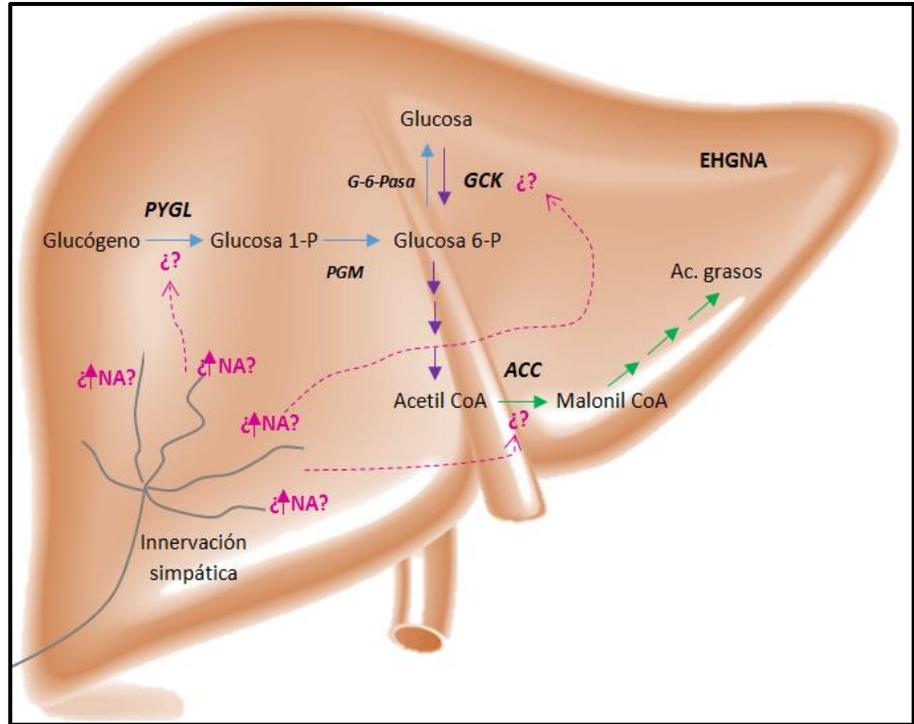
parte es metabolizada por la enzima monoaminooxidasa (MAO) (32) (34). Considerando la información anterior, estimamos fundamental estudiar la enzima tirosina hidroxilasa, ya que creemos que un incremento en la expresión de esta enzima estaría aumentando la tasa neta de síntesis de catecolaminas, en este caso, noradrenalina.



**Figura 2. Síntesis, liberación y metabolismo de noradrenalina.** 1) Biosíntesis; 2) Almacenamiento; 3) Liberación; 4) Unión a receptor; 5) Recaptación; 6) Metabolismo. *Elaboración propia.*

Creemos que el aumento persistente de leptina que ocurre en hijas de madres obesas (35) (36) conduce a un incremento de la estimulación nerviosa simpática, lo que lleva a una mayor cantidad de noradrenalina en el tejido hepático. En este sentido, ya que la descendencia de madres obesas muestra una alteración de enzimas fundamentales del metabolismo hepático (37), esperamos también, que un incremento de NA se relacione con

una alteración en la expresión de las enzimas clave en el metabolismo de la glucosa y lípidos en hígado, lo que puede explicar el desarrollo de EHGNA (Figura 3).



**Figura 3.** Un aumento de noradrenalina (NA) se relaciona con una alteración en la expresión de la enzima Glucógeno fosforilasa (PYGL), Glucoquinasa (GCK) y Acetil CoA carboxilasa (ACC), limitantes en las vías glucogenolítica (—→), glicolítica (—→) y lipogénica (—→) respectivamente, lo que podría explicar el desarrollo de enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA). PGM: fosfoglucomutasa; G-6-Pasa: Glucosa 6 fosfatasa; Glucosa 1-P: Glucosa 1-fosfato; Glucosa 6-P: Glucosa 6-fosfato. *Elaboración propia.*

## **Hipótesis**

La obesidad materna durante la etapa pregestacional, preñez y lactancia en ratas programa un aumento en la estimulación nerviosa simpática a nivel hepático en la descendencia, lo que modula la expresión de enzimas claves en el metabolismo de lípidos y carbohidratos conduciendo al desarrollo de enfermedad de hígado graso no alcohólico.

### **Objetivo General**

Evaluar el control simpático del hígado y su relación con la expresión de enzimas hepáticas fundamentales en el metabolismo de lípidos y carbohidratos en ratas adultas descendientes de madres con obesidad inducida por la dieta, en comparación con ratas cuyas madres fueron alimentadas con dieta control.

### **Objetivos Específicos**

- Medir el nivel sérico de leptina de ratas adultas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa en comparación con ratas control.
- Determinar la concentración de noradrenalina en el hígado de ratas adultas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa en comparación con ratas control.
- Cuantificar la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa en el hígado de ratas adultas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa en comparación con ratas control.
- Determinar la expresión de las enzimas glucógeno fosforilasa (PYGL), acetil CoA carboxilasa (ACC) y glucoquinasa (GCK) en el hígado de ratas adultas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa en comparación con ratas control.

## **Materiales y métodos**

### **Tipo de estudio**

Estudio analítico experimental longitudinal prospectivo

### **Animales**

Para este estudio se utilizó 20 ratas hembras de la cepa Sprague Dawley distribuidas en 2 grupos: 10 ratas hijas de madres alimentadas con dieta control previo y durante la preñez, y en el periodo de lactancia (Lab Diet, equivalente a 4 Kcal/g de alimento: 27% Proteína, 60% Hidratos de Carbono, 13% Lípidos) y 10 ratas hijas de madres alimentadas con dieta alta en grasa un mes antes de la preñez, durante ésta y en el periodo de lactancia (High Fat: HF, Research Diet™ USA, equivalente a 5 Kcal/g de alimento: 20% Proteína, 20% Hidratos de Carbono y 60% Lípidos). La serie experimental fue conservada en la sala de mantención de animales del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso en un ambiente con temperatura controlada, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, con agua y comida ad libitum. El Sr. Guillermo Rodríguez (Técnico de laboratorio) fue el encargado del lavado de jaulas y la Srta. Tania Cerda (Bioquímico, técnico de laboratorio) del seguimiento del peso corporal, ciclo estral, ingesta de alimentos y agua de los animales. Ambos profesionales están capacitados en la mantención y cuidado de animales de experimentación.

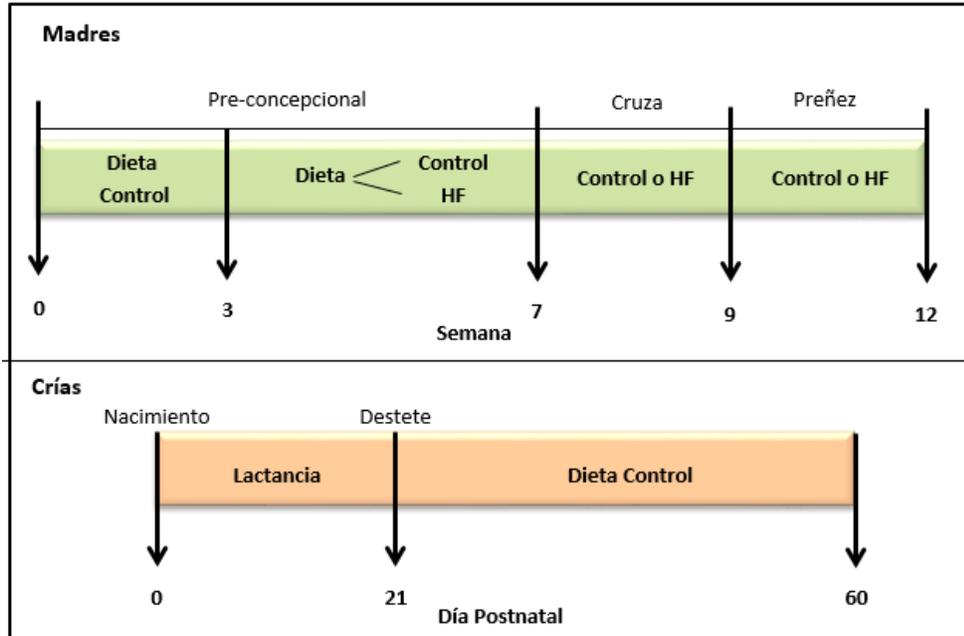
Las 2 primeras semanas de mantención de las ratas madres corresponde al periodo de aclimatación, en donde ambos grupos experimentales fueron alimentados con dieta control. Se registró diariamente la ingesta de alimento y peso corporal mediante el pesaje de la comida y los animales. La ciclicidad estral a través de frotis vaginal.

Desde la tercera semana, cada grupo experimental fue alimentado con su respectiva dieta: control y HF, lo que se mantiene hasta el periodo de destete, correspondiente a los 21 días de edad de las crías. Las ratas fueron consideradas obesas cuando hubo diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el tratado con dieta HF (38) (39).

Luego de cuatro semanas con su respectiva dieta, y encontrándose las hembras en la etapa proestro del ciclo estral, fueron cruzadas con machos reproductores alimentados con dieta control. La confirmación de la preñez se realizó mediante la observación de espermatozoides o de ocho diestros consecutivos en el frotis vaginal, posterior a la cruce. Las crías fueron sexadas al día postnatal (PND, por sus siglas en inglés) 1 mediante observación genital. Posterior al periodo de destete fueron separadas de sus madres y se les suministró dieta control. Las crías se sacrificaron mediante decapitación al PND 60 en la etapa estro del ciclo estral (Figura 4). Al momento de la eutanasia se recolectó sangre e hígado, entre otros tejidos y órganos. Al finalizar el período de lactancia, las ratas madres se sacrificaron por decapitación donde se recolectó sangre para extracción de suero. Los procedimientos de eutanasia fueron realizados por personal capacitado en bioética y manejo de animales de experimentación.

Se utilizó este modelo experimental, pues está demostrado por nuestro laboratorio que la descendencia de madres con obesidad inducida por una dieta alta en grasa evidencia signos como: mayor porcentaje de grasa en el órgano, niveles alterados de transaminasas hepáticas y mayor peso del hígado, lo que se relaciona con el desarrollo de EHGNA (14).

Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de Bioética de la Universidad de Valparaíso y el comité de Bioética de la Comisión Nacional de Investigación, Ciencia y Tecnología (CONICYT).



**Figura 4.** Diseño experimental de ratas madres (verde) y descendencia (rosado). *Elaboración propia.*

La serie experimental de la presente tesis está enmarcada en el proyecto FONDECYT de iniciación en investigación n° 11130707, cuyo investigador principal es el Dr. Gonzalo Cruz Neculpán.

### **Determinación de leptina sérica por Inmuno-ensayo ligado a enzima (ELISA)**

Se determinó la concentración de leptina en plasma de las crías mediante el análisis de las muestras de suero obtenidas luego de la eutanasia.

Se utilizó un kit comercial para la determinación por ELISA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (EMD Millipore, USA).

### **Semi-cuantificación de la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa en hígado por Western Blot**

Se homogenizó 20 mg de tejido en un volumen en microlitros de buffer RIPA correspondiente a 10 veces el peso del tejido. Posteriormente se centrifugó cada muestra para obtener una fracción purificada de proteínas. Se realizó electroforesis de proteína en un gel SDS-PAGE para luego ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con leche al 5%, y se utilizó como anticuerpo primario Anti-tyrosine hydroxylase Rabbit pAb Cat. 657012 SIGMA-ALDRICH para la enzima tirosina hidroxilasa y un anticuerpo secundario Anti-Rabbit IgG Cat. 7074S Cell Signaling conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Los resultados se normalizaron utilizando un anticuerpo para la proteína constitutiva GAPDH Cat. G9545 SIGMA-ALDRICH.

### **Detección de noradrenalina por Inmuno-ensayo ligado a enzima (ELISA)**

Los tejidos se homogeneizaron en el siguiente buffer: 0,01 N HCL, 4 mM metabisulfito de sodio y 1 mM de EDTA. Las muestras se homogenizaron en buffer de lisis correspondiente a 10 veces el peso del tejido. En estas condiciones la noradrenalina está cargada positivamente, reduciendo la unión a proteínas y además se optimiza su solubilidad. El Kit se utilizó según las condiciones del fabricante (ImmuSmol, Francia). Esto fue realizado en 3 etapas: la primera parte consiste en el paso de extracción y acilación de la noradrenalina; el segundo paso corresponde a la conversión enzimática de las muestras previamente aciladas para, finalmente, realizar la cuantificación por EIA de la noradrenalina.

### **Determinación de la concentración de proteínas en hígado**

La determinación de concentración de proteínas se realizó con el kit Biorad Protein Assay, utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar de proteínas. Estos datos fueron utilizados para normalizar los valores obtenidos de NA.

### **Determinación de la expresión de glucoquinasa, glucógeno fosforilasa y acetil CoA carboxilasa en hígado por RT- PCR en tiempo real**

La extracción de RNA total en hígado se realizó con E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (OMEGA BIO-TEK, Cat. R6834-02CH). Para la transcripción reversa se utilizó la enzima SuperScript II (Invitrogen, Cat. 18064-014), random primers (Invitrogen, Cat. 48190-011) e inhibidor de RNAasa (RNase OUT, Invitrogen, Cat. 10777-019).

El cDNA obtenido de la transcripción reversa se amplificó por PCR en tiempo real, utilizando los partidores descritos en la tabla 1:

Gen	Partidor Forward	Partidor Reverse
18s	5' – TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG – 3'	5'- TTC GAT GAA GGT GAT TTC GCA- 3'
Glucoquinasa hepática	5' –GTG GTG CTT TTG AGA CCC GTT-3'	5'- TTC GAT GAA GGT GAT TTC GCA-3'
Glucógeno fosforilasa hepática	5' –CCC GAG CAC CCA ATG ACT TTA ACC-3'	5'- GCG AGT GCG GGA TGT GTG TCA-3'
Acetil CoA carboxilasa hepática	5' – AAC ATC CCG CAC CTT CTT CTA C-3'	5'- CTT CCA CAA ACC AGC GTC TC-3'

**Tabla 1. Partidores de enzimas PYGL, ACC, GCK y gen constitutivo 18s.**

Los datos fueron normalizados por el gen constitutivo 18s.

Las condiciones de tiempo y temperatura utilizadas en cada ciclo de amplificación para cada gen se resumen en la tabla 2:

Gen	Desnaturalización	Alineación	Elongación
18s	95°C x 10 seg.	60°C x 30 seg.	72°C x 30 seg.
Glucoquinasa hepática	95°C x 10 seg.	59°C x 15 seg.	72°C x 20 seg.
Glucógeno fosforilasa hepática	95°C x 10 seg.	65°C x 15 seg.	72°C x 20 seg.
Acetil coenzima A carboxilasa hepática	95°C x 10 seg.	61°C x 15 seg.	72°C x 20 seg.

**Tabla 2. Condiciones de tiempo y temperatura utilizados en PCR en tiempo real.**

## **Análisis Estadístico**

Todos los resultados de esta tesis son expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar medio (SEM). Los datos fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism® versión 6.01. Para observar el tipo de distribución de la muestra se utilizó el test de normalidad D'Agostino-Pearson. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la prueba de comparación de media t-student, ya que todas las variables tenían una distribución normal. Se considera \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  para indicar diferencias estadísticamente significativas.

## Resultados

### Peso corporal

En la figura 5 se muestra el peso corporal (g) de las ratas descendientes de madres alimentadas con dieta HF y dieta control a los 60 días de edad. Observamos que las ratas descendientes de madres alimentadas con dieta HF presentan un mayor peso corporal (g) al PND 60 en relación a las crías de madres alimentadas con dieta Control.

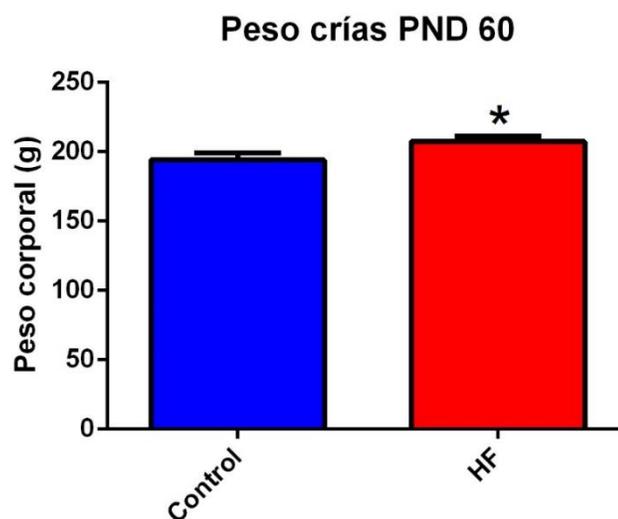
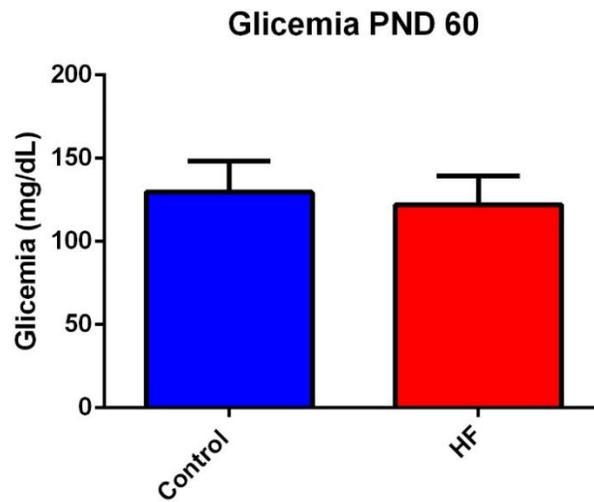


Figura 5. Peso corporal de crías al día postnatal 60. El gráfico representa el peso de las crías (g) Control (n=10) y HF (n=10). Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .

### Niveles de glucosa sérica

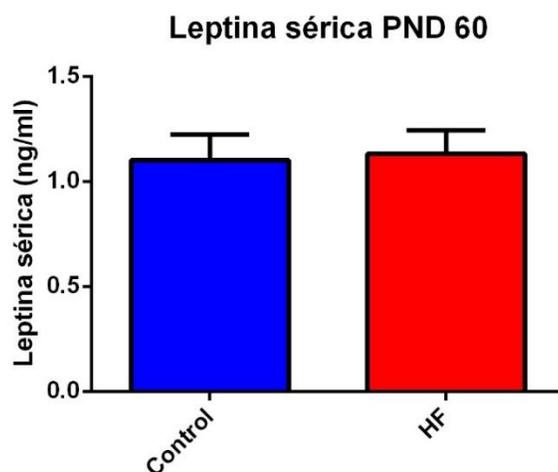
En la figura 6 se observa que la glucosa plasmática (mg/dL) no muestra diferencias significativas entre ambos grupos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 6. Glucosa plasmática al día postnatal 60.** El gráfico representa los niveles de glicemia (mg/dL) en crías Control (n=10) y HF (n=10). Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$ SEM. \* $p < 0,05$ .

### **Niveles de leptina sérica**

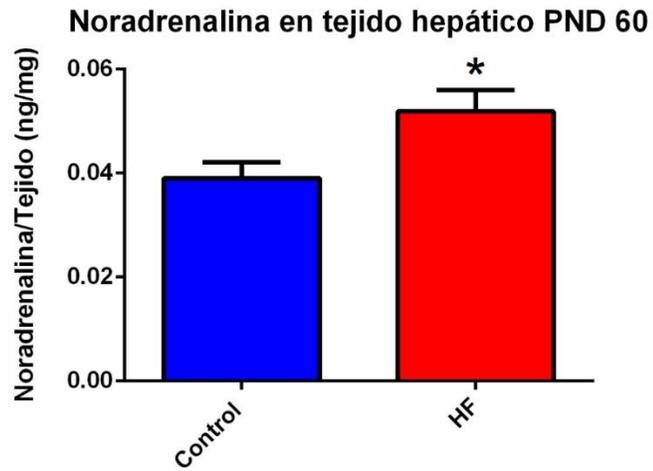
Se determinó los niveles de leptina sérica (ng/ml) en ambos grupos al día postnatal 60. En la figura 7 se puede observar que la concentración sérica de leptina entre el grupo Control y HF no presenta diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 7. Leptina sérica al día postnatal 60.** El gráfico representa la leptina sérica (ng/ml) al día postnatal 60 en crías Control (n=10) y HF (n=10). Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SEM.

### **Niveles de noradrenalina en hígado**

Para observar si existe una relación entre el sistema adrenérgico y el desarrollo de EHGNA se determinó la concentración de NA (ng/mg) en tejido hepático en el grupo Control y HF. En la figura 8 podemos ver que existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre ambos grupos, en donde el grupo HF tiene mayor concentración de NA en hígado respecto al grupo Control.

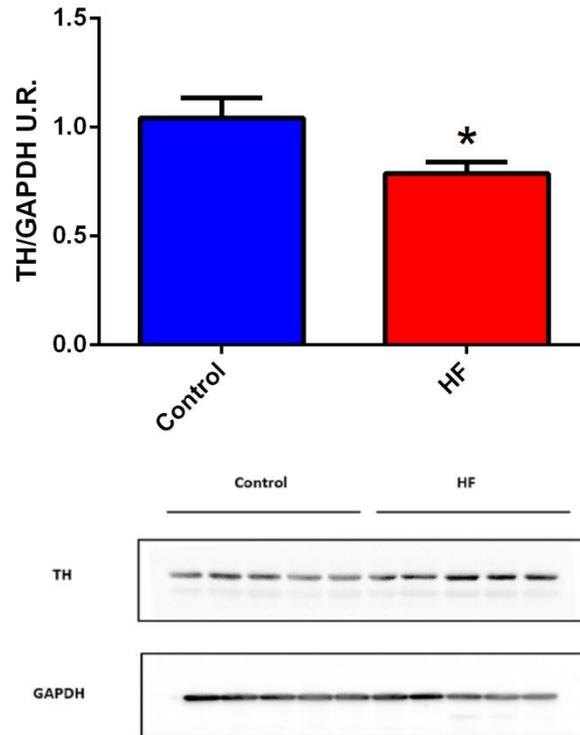


**Figura 8. Noradrenalina en tejido hepático al día postnatal 60.** El gráfico representa la concentración de noradrenalina (ng) en razón a la muestra de tejido hepático (mg) en crías Control (n=10) y HF (n=10). Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .

### **Expresión de tirosina hidroxilasa en hígado**

En la siguiente figura podemos apreciar una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de TH en unidades relativas (U.R.) presente en tejido hepático de las crías de madres alimentadas con dieta HF en comparación con las crías de madres alimentadas con dieta Control.

### Tirosina hidroxilasa en tejido hepático PND 60



**Figura 9. Tirosina hidroxilasa en tejido hepático al día postnatal 60.** El gráfico representa la expresión de tirosina hidroxilasa (U.R.) normalizado con la proteína constitutiva GAPDH en crías Control (n=10) y HF (n=10). Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ .

Con el fin de conocer la influencia del sistema adrenérgico sobre las enzimas involucradas en el metabolismo de glucosa y lípidos y su relación con el desarrollo de EHGNA, se determinó la expresión de éstas en tejido hepático en el grupo Control y HF, como se muestra en las figuras 10,11 y 12.

### Expresión de glucógeno fosforilasa en hígado

En la figura 10 es posible observar que existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre ambos grupos, en donde el grupo HF presenta una expresión 40% mayor de la enzima glucógeno fosforilasa en hígado.

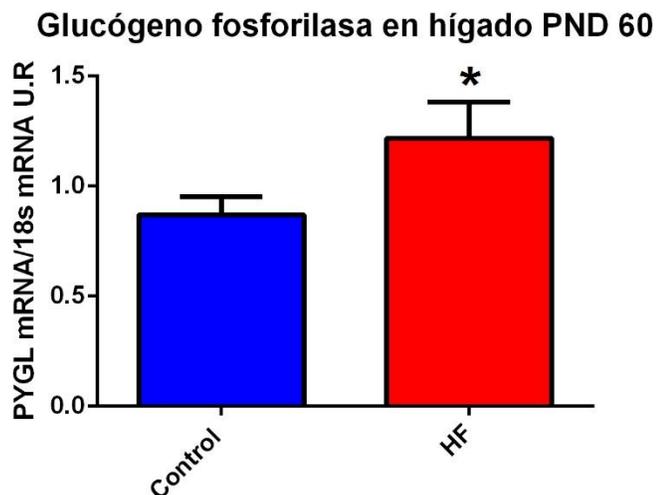
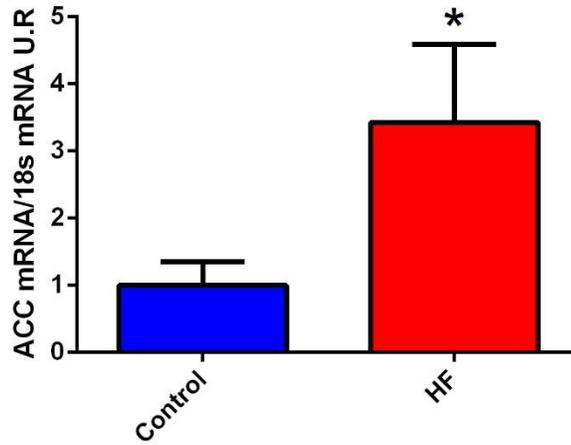


Figura 10. Glucógeno fosforilasa en tejido hepático al día postnatal 60. El gráfico representa el mRNA de la enzima glucógeno fosforilasa normalizado por el gen constitutivo 18s en crías Control (n=10) y HF (n=10). Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$ SEM. \* $p < 0,05$ .

### Expresión de Acetil CoA carboxilasa en hígado

En la figura 11 es posible observar que existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre ambos grupos, en donde el grupo HF presenta una expresión 246% mayor de la enzima Acetil-CoA carboxilasa en hígado.

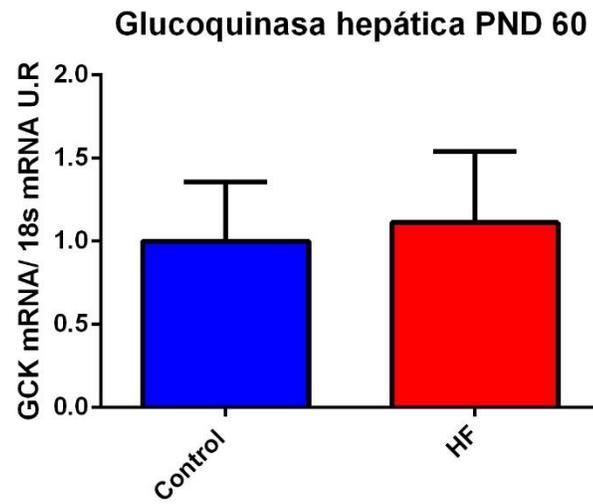
### Acetil-CoA carboxilasa en hígado PND 60



**Figura 11. Acetil-CoA Carboxilasa en tejido hepático al día postnatal 60.** El gráfico representa el mRNA de la enzima Acetil-CoA carboxilasa normalizado por el gen constitutivo 18s en crías Control (n=10) y HF (n=10). Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$ SEM. \*p<0,05.

### Expresión de glucoquinasa hepática

La expresión de la enzima glucoquinasa hepática no presentó diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre el grupo Control y HF, como se puede ver en la figura 12.



**Figura 12. Glucoquinasa hepática en tejido hepático al día postnatal 60.** El gráfico representa el mRNA de la enzima glucoquinasa hepática normalizado por el gen constitutivo 18s en crías Control (n=10) y HF (n=10). Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$ SEM.

## Discusión

Si bien, la etiopatogenia del EHGNA ha sido ampliamente investigada, consideramos fundamental estudiar las enzimas involucradas en lipogénesis, glucogenólisis y glicólisis, ya que podrían ser las responsables de la acumulación de lípidos a nivel hepático y desarrollo de enfermedad hepática no alcohólica en la descendencia de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa. En el presente estudio observamos que existe un aumento de la expresión de PYGL en el grupo HF (Figura 10). A pesar de que el mecanismo mediante el cual NA regula la expresión de esta enzima no está descrito, existe evidencia de que esta catecolamina aumenta la actividad de la enzima (40). Esto se atribuye a la unión de la NA a su receptor  $\alpha 1$ -adrenérgico (41) (acoplado a proteína Gq) que, por acción de la cascada de fosforilación, finalmente activa la enzima mediante la adición de un grupo fosfato a través de la Proteína Kinasa A (PKA).

Recientemente se ha identificado que la activación de receptores  $\beta$  adrenérgicos (acoplados a proteína Gs) median la activación de la enzima glucógeno fosforilasa kinasa a través de la vía AMPc/PKA, enzima que posteriormente activa a la PYGL mediante una fosforilación en serina (42). La PYGL, una vez activada, segmenta secuencialmente los enlaces glucosídicos para producir glucosa-1-fosfato (G-1-P) que por acción de la fosfoglucomutasa genera glucosa-6-fosfato (G-6-P) (43), que posteriormente se utiliza como sustrato para otras vías metabólicas. Si bien no existen evidencias de la regulación transcripcional de la enzima PYGL por catecolaminas, en el promotor del gen PYGL se encuentra la secuencia CGTCA, como elemento de respuesta a AMPc (cAMP response element, CRE) y sitio de unión al factor de transcripción CREB (44), el que es fosforilado por PKA (45). En este

contexto, creemos que la activación de la vía AMPc/PKA/CREB puede ser la causa del incremento en la expresión de PYGL que observamos en nuestro estudio. De hecho, la expresión de la isoforma muscular de la enzima glucógeno fosforilasa (PYGM) es inhibida por insulina e inducida por la vía AMPc/PKA/CREB, cuyos activadores son principalmente glucagón y catecolaminas (46), y creemos que ocurre lo mismo con la isoforma hepática.

La expresión de ACC, enzima limitante en el proceso de lipogénesis, también se encuentra aumentada en el grupo HF (Figura 11). No obstante, en nuestra hipótesis se plantea que el mecanismo es mediado por la actividad del sistema adrenérgico a través de noradrenalina, pero su efecto sobre la expresión de la enzima no ha sido dilucidado aún.

Según Yin y cols. glucagón reduce la transcripción de mRNA para enzima ACC (47) y lo mismo sucede con GCK, que también se ve disminuida por la acción de esta hormona (48). Ya que glucagón y noradrenalina ejercen su efecto mediante la vía de la adenilciclase (49) (50), creemos que de esta manera el sistema adrenérgico estaría regulando la expresión enzimática de ACC y GCK, que por acción del adenosin monofosfato ciclico (AMPc) activa la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), que a su vez fosforila enzimas o factores de transcripción claves en el metabolismo hepático de lípidos y glucosa (45) (51).

Sin embargo, la ACC está regulada principalmente por acción de la insulina (52). Es por esto que, en base a estudios previos, creemos que el incremento de insulina que ocurre en el grupo HF (53) (54) estaría modulando el aumento de la expresión de la enzima en cuestión y con esto la lipogénesis, a través del factor de transcripción “proteína de unión al elemento regulador del estero -1c” (SREBP-1c) (55) (56). Asimismo, se ha evidenciado que la expresión de GCK también se ve regulada positivamente por insulina a través de

SREBP-1c (57), no obstante, la expresión de la enzima glucoquinasa hepática en este estudio no mostró diferencia entre ambos grupos (Figura 12), esto se puede atribuir a que la transcripción de GCK es dosis-dependiente (48), sin existir mayor regulación mediante noradrenalina o insulina, por tanto, podría existir una contrarregulación entre ambas hormonas, lo que justifica los resultados obtenidos entre el grupo control y HF.

Por lo tanto, la expresión de las enzimas PYGL, ACC y GCK está regulada por insulina y NA, hallándose esta última aumentada en nuestros resultados (Figura 8), sin embargo, la enzima limitante en su biosíntesis, tirosina hidroxilasa, se encuentra disminuida (Figura 9). Este resultado no era esperado, ya que atribuíamos el aumento de NA al incremento de la expresión de la TH.

Creemos que la degradación de NA en los terminales nerviosos podría estar disminuida al igual que la síntesis de TH, así estos mecanismos en su conjunto podrían explicar los resultados obtenidos. Es por esto que sugerimos que en investigaciones futuras se estudie 3-metoxi 4-hidroxifenilglicol (MHPG), metabolito de la degradación de NA por acción de la enzima MAO y así conocer si la degradación de noradrenalina se encuentra o no disminuida. Además, estudiar si la síntesis, actividad y/o degradación de TH se encuentran alteradas.

Un estudio reciente demuestra que la microinyección de leptina directamente a nivel de núcleo arcuato, área en donde además del núcleo paraventricular y ventromedial del hipotálamo, se expresan sus receptores (58) (59), genera aumento de glucosa sérica lo que se explica por el incremento de la actividad nerviosa simpática en hígado (60).

En diversas investigaciones con un modelo experimental similar al nuestro, se ha demostrado que las crías de madres con obesidad inducida por la dieta presentan hiperleptinemia durante las primeras semanas de vida (PND 2, 22, 27) (35) (36). Sin embargo, los resultados de nuestro estudio no muestran una diferencia significativa en los niveles de leptina sérica en las crías del grupo Control versus las crías del grupo HF (Figura 7). Esto podría explicarse por la existencia de resistencia a la insulina desarrollada en la adultez, demostrada por nuestro grupo de investigación en este modelo experimental (54), la que genera un aumento de la lipólisis (23), disminuyendo así la hiperleptinemia al PND 60.

Por último, es importante destacar que un aumento de las enzimas PYGL y ACC, implican mayor síntesis de ácidos grasos y triglicéridos a nivel hepático, a lo que se suma una alteración en el transporte de VLDL mediado por insulina, lo que provoca una mayor acumulación de triglicéridos en hígado (23) (24), condición característica en EHGNA.

Es fundamental acentuar que las ratas de ambos grupos experimentales fueron alimentadas con dieta control después del destete, lo que demuestra que los cambios metabólicos observados en la descendencia se deben a la programación perinatal de las crías a causa de la alimentación materna en el periodo preconcepcional, gestacional y durante la lactancia.

Finalmente, no se puede afirmar que en crías de madres obesas la leptina, a través de la estimulación simpática, sea responsable de generar EHGNA mediante la alteración de las enzimas hepáticas estudiadas. Sin embargo, el SNS estaría contribuyendo al mecanismo por el cual aumenta la acumulación de lípidos en hígado debido a un incremento de NA, pues si bien no es fundamental en la vía de lipogénesis, aporta con el aumento de sustrato, glucosa

6-fosfato (61), que sumado a la disminución de glucosa 6-fosfatasa descrita en pacientes con enfermedad hepática crónica (62) genera que el producto final de la glucogenólisis, glucosa, no sea exportada a circulación y de esta forma la glicemia no muestre diferencias entre los grupos experimentales (Figura 6). Los resultados de esta tesis ratifican que EHGNA es multifactorial y es necesario continuar investigando el rol del SNS en el origen de la enfermedad hepática no alcohólica.

## **Conclusiones**

- La descendencia de ratas madres alimentadas con una dieta alta en grasa no presenta diferencia en los niveles de leptina sérica en relación a la descendencia de madres alimentadas con dieta control.
- Las ratas hijas de madres obesas presentan una disminución en los niveles de TH hepática en comparación a las ratas hijas de madres control.
- Los niveles de NA en hígado se encuentran aumentados en ratas hijas de madres alimentadas con una dieta alta en grasa.
- En el grupo HF la expresión de las enzimas PYGL y ACC se encuentra aumentada, mientras que la enzima GCK no presenta cambios, en comparación al grupo Control.

## Bibliografía

1. [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/), último acceso: 28 de Octubre de 2016.
2. Mendis S. Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2014. Ginebra, 2014.
3. MINSAL. Encuesta Nacional de Salud 2009-2010. Santiago, 2010.
4. Flegal K, Carroll M, y Kit B. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *The Journal of American Medical Association*, 2012: 491-497.
5. Farías M. Obesidad materna: severo problema de salud pública en Chile. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 2013: 409-412.
6. DEIS, MINSAL. Indicadores básicos de salud Chile 2014. Santiago, 2014.
7. OMS. Maternal anthropometry and pregnancy outcomes. *The scientific journal of WHO*, 1995: 1-48.
8. Atalah E, Castro R. Obesidad materna y riesgo reproductivo. *Revista médica de Chile*, 2004: 923-928.
9. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba foundation symposium*, 1991: 38-55.
10. Hales C, Barker D. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *International journal of epidemiology*, 2013: 1215-1222.
11. Vieau D. Perinatal nutritional programming of health and metabolic adult disease. *World journal of diabetes*, 2011: 133-136.
12. Samuelsson A, Matthews P, Argenton M. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension*, 2008: 383-392.
13. Strakovsky R, Zhang X, Zhou D, Pan Y. Gestational high fat diet programs hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and histone modification in neonatal offspring rats. *The journal of physiology*, 2011: 2707-2717.
14. Ambrosetti V, Guerra M, Ramirez L, Cruz G. Increase in endogenous estradiol in the progeny of obese rats is associated with development in adulthood. *Endocrine international journal of basic and clinical endocrinology*, 2016.

15. Aagaard-Tillery K, Grove K, Bishop J. Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: maternal diet modifies the primate fetal epigenome. *Journal of molecular endocrinology*, 2008: 91-102.
16. Bringhenti I, Ornellas F, Martins M, Mandarin-de-Lacerda C, Aguila M. Early hepatic insult in the offspring of obese maternal mice . *Nutrition research*, 2015: 136-145.
17. Oben J, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Li Z, Torbenson M, Thomas S, Diehl A. Norepinephrine induces hepatic fibrogenesis in leptin deficient ob/ob mice. *Biochemical and biophysical research communication*, 2003: 284-292.
18. Matteoni C, Younossi Z, Gramlich T, Boparai N, Liu Y, McCullough A. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, 1999: 1413-1419.
19. Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Progress in lipid research*, 2009: 1-26.
20. Brumbaugh D, Friedman J. Developmental origins of nonalcoholic fatty liver disease. *Pediatric research*, 2014: 140-147.
21. Pacheco D. *Bioquímica médica*. México, 2004.
22. Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Digestive diseases*, 2010: 155-159.
23. Solís J, García I, Pérez M, Muñoz M. Non-alcoholic fatty liver disease. From insulin resistance to mitochondrial dysfunction. *Revista española de enfermedades digestivas*, 2008: 195-201.
24. Samuel V, Schulman G. *Insuline resistance in NAFLD: potencial mechanisms and therapies*. Blackwell Publishing, 2005.
25. Koeppe B, Stanton B. *Berne y Levy Fisiología*. Barcelona, 2009.
26. Medina J, Moreno-Otero R. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. *Drugs*, 2005: 2445-2461.
27. Commins S, Marsh D, Watson S, Thomas P, Pagett M, Palmiter R, Gettys W. Norepinephrine is required for leptin effects on gene expression in brown and white adipose tissue. *Endocrinology*, 1999: 4772-4778.

28. Zeng W, Pirzgalska R, Pereira M, Kubasova N, Barateiro A, Seixas E, Lu Y, Kozlova A, Voss H, Martins G, Friedman J, Domingos A. Sympathetic neuro-adipose connections mediate leptin-driven lipolysis. *The journal cell*, 2015: 84-94.
29. Huber D, Schreihof A. Attenuated baroreflex control of sympathetic nerve activity in obese Zucker rats by central mechanisms. *The journal of physiology*, 2010: 1515-1525.
30. Shimazu T. Central nervous system regulation of liver and adipose tissue metabolism. *Diabetologia*, 1981: 343-356.
31. Rojas J, Bruinstroop E, Printz R, Alijagic-Boers A, Foppen E, Turney M, George L, Beck-Sickinger A, Kalsbeek A, Niswender K. Central nervous system neuropeptide Y regulates mediators of hepatic phospholipid remodeling and very low-density lipoprotein triglyceride secretion via sympathetic innervation. *Molecular metabolism*, 2015: 210-221.
32. Buitrago P. *Nuevos métodos analíticos para la determinación de catecolaminas*. Servicio de publicaciones de Universidad de Castilla- La Mancha, 1997.
33. Peaston R, Weinkove C. Measurement of catecholamines and their metabolites. *Annals of clinical biochemistry*, 2004: 17-38.
34. Delgado A, Minguillón C, Joglar J. *Introducción a la química terapéutica*. Madrid, 2003.
35. Connor K, Vickers M, Beltrand J, Meaney J, Sloboda D. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. *The journal of physiology*, 2012: 2167-2180.
36. Howie G, Sloboda D, Kamal T, y Vickers M. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *The journal of physiology*, 2009: 905-915.
37. Alfaradhi M, Fernandez-Twinn D, Martin-Gronert M, Musial B, Fowden A, Ozanne S. Oxidative stress and altered lipid homeostasis in the programming of offspring fatty liver by maternal obesity. *American journal of physiology regulatory*, 2014: 26-34.
38. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer L. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*, 2007: 798-808.
39. Harini N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition research reviews*, 2010: 270-299.

40. Püschel G, Miura H, Neuschäfer-Rube F, Jungermann K. Inhibition by the protein kinase c activator 4b-phorbol 12-myristate 13-acetate of the prostaglandin F2a-mediated and noradrenaline-mediated but not glucagon-mediated activation of glycogenolysis in rat liver. *European journal of biochemistry*, 1993: 305-311.
41. Burcelin R, Uldry M, Foretz M, Perrin C, Dacosta A, Nenniger-Tosato M, Seydoux J, Cotecchia S, Thorens B. Impaired glucose homeostasis in mice lacking the  $\alpha 1b$ -adrenergic receptor subtype. *The journal of biological chemistry* , 2004: 1108-1115.
42. Han H, Kang G, Kim J, Choi B, Koo S. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Experimental & molecular medicine*, 2016: 1-10.
43. Melo V, Cuamatzi O. *Bioquímica de los procesos metabólicos* . México, 2007.
44. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. 2001: 599-609.
45. Casado M. Regulación de la expresión génica por glucosa. Madrid, 2005, 125-147.
46. Reynet C, Kahn C, Loeken M. Expression of the gene encoding glycogen phosphorylase is elevated in diabetic rat skeletal muscle and is regulated by insulin and cyclic AMP. *Diabetología*, 1996: 183-189.
47. Yin L, Zhang Y, Charron T, Bradley F. Thyroid hormone, glucagon, and medium-chain fatty acids regulate transcription initiated from promoter 1 and promoter 2 of the acetyl-CoA carboxylase-K gene in chick embryo hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000: 91-99.
48. Iynedjian P, Jotterand D, Nouspikel T, Asfari M, Pilot P. Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by glucagon-cAMP system. *The journal of biological chemistry*, 1989: 21824-21829.
49. Hernández M, Sastre A. *Tratado de nutrición*. Madrid, 1999.
50. Tellez J. La noradrenalina, su rol en la depresión. *Revista colombiana de psiquiatría*, 2000: 60-63.
51. Gil A. *Tratado de nutrición: bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. Madrid, 2010.
52. Kim K, Tae H. Pattern and regulation of acetyl-CoA carboxilase gene expression. *The journal of nutrition*, 1994: 1273-1283.
53. Pérez F. Reprogramación y enfermedades crónicas. *Revista chilena de endocrinología y diabetes*, 2016: 49-50.

54. Olguín G, Álvarez D. Efectos del tratamiento con metformina previo y durante la preñez en ratas madres obesas sobre la función reproductiva de la descendencia femenina. Valparaíso, 2015.
55. Serviddio G, Bellanti F, Vendemiale G. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013: 952-968.
56. Shimomura I, Batshmakov Y, Ikemoto S, Horton J, Brown M, Goldstain J. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 1999: 13656-13661.
57. Fodetz M, Guichard C, Ferré P, Fougelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 1999: 12737-12742.
58. Schwartz M, Seeley R, Campfield L, Burn P, Baskin D. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *The journal of clinical investigation*, 1996: 1101-1106.
59. Elmquist J, Bjorbaek C, Ahima R, Flier J, Saper C. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *The journal of comparative neurology*, 1998: 535-547.
60. Tanida M, Yamamoto N, Morgan D, Kurata Y, Shibamoto T, Rahmouni K. Leptin receptor signaling in the hypothalamus regulates hepatic autonomic nerve activity via phosphatidylinositol 3-kinase and AMP-activated protein kinase. *The journal of the neuroscience*, 2015: 474-484.
61. Pozzo L, Vornoli A, Coppola I, Della Croce C, Giorgetti L, Gervasi P, Longo V. Effect of HFD/STZ on expression of genes involved in lipid, cholesterol and glucose metabolism in rats. *Life Sciences*, 2016: 149-156.
62. Konopelska S, Kienitz T, Quinkler M. Downregulation of hepatic glucose-6-phosphatase- $\alpha$  in patients with hepatic steatosis. *Obesity*, 2011: 2322-2326.