



FACULTAD DE FARMACIA

ESCUELA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA

CARRERA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA

**“RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES SÉRICOS DE LEPTINA Y EL CONTENIDO
DE NORADRENALINA EN EL OVARIO Y TEJIDO ADIPOSO EN LA
DESCENDENCIA DE RATAS OBESAS”**

KARINA BELÉN CEBALLO GAJARDO

Tesis para optar al título de Nutricionista

Grado académico de Licenciado de Nutrición y Dietética

DIRECTOR: GONZALO CRUZ NECULPÁN PhD

Valparaíso, 2016

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada principalmente por el proyecto FONDECYT INICIACION

11130707 del programa FONDECYT, CONICYT. Del profesor Gonzalo Cruz.

Parte del financiamiento de esta tesis se obtuvo del Centro de Neurobiología y Plasticidad

Cerebral (CNPC) de la Universidad de Valparaíso.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, principalmente a mi madre Carmen Gajardo que siempre me animó, consoló y cuidó, gracias por su infinita paciencia y su capacidad de alimentarme cuando la maña se apoderaba de mí. A mi padre, Luis Ceballo, quien me apoyó, madrugó y corrió cada día que fuese necesario para cumplir la misión de llegar a tiempo a cada clase y práctica. A mis hermanos y sus familias, Cristián Ceballo y Matías Ceballo, siempre han confiado en mí y mis capacidades. A Gilena Ceballo, mi hermana del alma, por hacer de mis “pausas de trabajo” las mejores, acompañarme en mis locuras e ideales y estar conmigo cuando más lo necesitaba, ¿Qué haría sin ti Gigena? A Raúl Riquelme por su entrega de amor y regalones infinitos cuando el ánimo estaba bajo.

Gracias a todo el equipo de trabajo que conforma el laboratorio. A Tania por su enorme labor y dedicación. A Camila y Javiera, por su gran ayuda y hacerme sentir que no estaba sola en la aventura de la tesis. A Daniela Alvarez, por su apoyo y orientación fundamental.

Agradezco enormemente al profesor Gonzalo Cruz, por ser un gran guía desde el primer día de trabajo, entregando tiempo, dedicación y apoyo. Y por sobre todo, aceptar mis caprichos y darme la posibilidad de conocer la ciencia e importancia de la nutrición y fisiología.

Finalmente, gracias al Dr. Ramón Sotomayor, Jonathan, Fabrizzio y Mónica por su colaboración y aporte de conocimientos.

ÍNDICE

FINANCIAMIENTO	3
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
MARCO TEÓRICO	10
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	19
General:	19
Específicos:	19
METODOLOGÍA	20
Tipo de estudio.	20
Animales.	20
Variables:	20
Diseño experimental.	20
Homogenización de tejido ovárico y adiposo para medición de NA.	22
Cuantificación de Proteínas	22
Determinación de noradrenalina por cromatografía líquida de alta precisión acoplado a detección electroquímica (HPLC-EC).	23
Determinación de leptina sérica y NA en tejido adiposo por ELISA.	23

Determinación de expresión génica de <i>Lep</i> , <i>Adrb2</i> en tejido adiposo y <i>Adrb3</i> en ovario por PCR en tiempo real.	24
Análisis estadístico.	25
RESULTADOS	26
1. Niveles séricos de leptina en ratas descendientes de madres obesas comparadas con ratas controles a los 60 días de edad.	26
2. Niveles de expresión génica de 27	
3. Niveles de Noradrenalina en ovario y tejido adiposo en ratas descendiente de madres obesas comparadas con controles a los 60 días de edad.	28
4. Niveles de expresión génica del 29	
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXOS	50
Anexo 1: Caracterización alimentaria de las madres.	50
Anexo 2: Ingesta energética de las madres en pre-concepción.	50
Anexo 3: Peso corporal de las madres luego en pre-concepción.	51
Anexo 4: Peso corporal de las ratas descendientes de madres obesas comparado con ratas controles.	51

RESUMEN

En Chile más de un 50% de las mujeres embarazadas presenta un exceso de peso. Esta condición se asocia a un mayor riesgo de desarrollar enfermedades reproductivas y metabólicas en la etapa adulta de la descendencia. El ovario y tejido adiposo poseen una regulación nerviosa dada por fibras simpáticas que son reguladas por el hipotálamo. Una de las formas de activación del sistema simpático a nivel central está dada por la acción de la leptina a nivel del hipotálamo, razón por la cual la hiperleptinemia podría provocar alteraciones en la actividad simpática y su regulación en el ovario y tejido adiposo. Este estudio busca demostrar una correlación entre los niveles de leptina sérica y una potencial alteración simpática a nivel de ovario y tejido adiposo, en ratas adultas descendientes de madres con obesidad gestacional inducida por el consumo de una dieta alta en grasa. Para ello se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley, sometidas a dieta control o alta en grasa previo y durante la preñez y lactancia. Se analizó en la descendencia los niveles séricos de leptina, el contenido de noradrenalina (NA) en ovario y en tejido adiposo, la expresión génica del receptor adrenérgico beta 2 en ovario y expresión génica del receptor adrenérgico beta 3 y de leptina en tejido adiposo. Se determinó que las crías de madres obesas presentaron una tendencia al aumento en los niveles de leptina sérica, un mayor contenido de NA en el ovario y una expresión aumentada de los receptores beta 2 adrenérgicos en ovario en comparación con crías controles. Por otro lado, no se apreciaron diferencias en tejido adiposo entre ambos grupos. Concluimos que la alteración simpática asociada a una hiperleptinemia provocada por la obesidad gestacional puede conducir a alteraciones a nivel reproductivo en la descendencia.

ABSTRACT

Relationship between plasmatic leptin levels and content noradrenaline in ovary and in adipose tissue in offspring of obese mothers

In Chile more than 50% of pregnant women are overweight. This condition is associated with a higher risk of developing reproductive and metabolic diseases during adulthood. The ovaries and the fatty tissue possess a nervous regulation by sympathetic fibers which are regulated by the hypothalamus. One of the activation pathways of the sympathetic system at a central level is given by the actions of leptin at the hypothalamus level, which is why hyperleptinemia could lead to alterations in sympathetic activity and its regulation in the ovarium and fat tissue. This study aims to prove a positive association between the levels of serum leptin and a potential sympathetic alteration at the ovaries level and fatty tissues in adult rats which are offspring of dams with gestational obesity due to a high fat diet. For this purpose, Sprague-Dawley strains were used, who underwent a control diet or high fat diet previously and during pregnancy and lactation. The offspring was analyzed for serum levels of leptin, noradrenaline (NA) content in the ovaries and fatty tissue, gene expression of a beta-2 adrenergic receptor in the ovaries and gene expression of beta-3 adrenergic receptor and leptin in the fatty tissue. It was determined that the offspring of obese mothers presented a tendency to increased levels of leptin in serum, a greater content of NA in the ovaries and a greater expression of beta-2 adrenergic receptors in the ovaries compared to the control offspring. On the other hand, there were no apparent differences in the fatty tissue in either group. We conclude that the sympathetic alteration associated to a

hyperleptinemia caused by gestational obesity could lead to alterations at a reproductive level in the offspring.

MARCO TEÓRICO

El sobrepeso y la obesidad (ambas condiciones consideradas mal nutrición por exceso) se definen como la acumulación de grasa excesiva que puede deteriorar la salud. Ambas condiciones presentan una prevalencia alta a nivel mundial. La malnutrición por exceso se presenta en la mayor parte de los países del mundo siendo un importante problema de salud pública, llevando a una disminución de la esperanza de vida y generando altos costos sociales y económicos (1).

Desde 1980 al año 2014 la prevalencia de mal nutrición por exceso fue en aumento, incrementando de un 28,8% a un 36,9% en el caso de los hombres y del 29,8% al 38% en el de las mujeres (2). Asimismo, la obesidad se duplicó en 2014 encontrándose en el 10% de los hombres y el 14% de las mujeres de 18 años o más con obesidad (3). Según la Encuesta Nacional de Salud del año 2010, Chile no queda ajeno a esta situación. De hecho, el 66,3% de la población entre 15 y 64 años presenta un exceso de peso; de ellos un 39% sufre de sobrepeso, un 25% posee obesidad y un 2,3% presenta obesidad mórbida. La condición de mal nutrición por exceso se acentúa en las mujeres, presentando una prevalencia de 64,3% de exceso de peso. Dentro de este grupo el 51% se encuentra entre los 15 y 44 años de edad, es decir, más de la mitad de las mujeres chilenas en edad fértil presenta sobrepeso u obesidad (4). Esto se refleja en el aumento de mujeres embarazadas con sobrepeso y obesidad, encontrándose que un 59% de las embarazadas que se controlaban en el Sistema Nacional de Servicios de Salud en el año 2013 presentaban exceso de peso (5).

Efectos de la obesidad gestacional sobre la descendencia.

La obesidad gestacional y la ganancia de peso durante la gestación son reconocidas como factores de riesgo independientes para complicaciones materno-fetales (6). Diversos estudios han asociado diferentes morbilidades materno-perinatales con obesidad gestacional, encontrando entre ellas diabetes gestacional, hipertensión gestacional, preeclampsia, aborto recurrente, macrosomía, mortalidad materna y fetal (7).

Por otro lado, la obesidad gestacional genera efectos a largo plazo sobre la descendencia (8). Lucas en el año 1991 describe el término de "*Programming*", referido al efecto de diversos estímulos (hormonas, metabolitos y neurotransmisores) que actuando en un periodo crítico o sensible de la vida de un individuo ejercen un efecto a largo plazo en una estructura somática o un sistema fisiológico (9). En este contexto se ha sugerido que la mal nutrición materna (obesidad o desnutrición gestacional) altera el medio ambiente intrauterino, lo que conduce al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas en la etapa adulta (10, 11). Desde entonces varios estudios en animales de experimentación han investigado la relación entre la obesidad gestacional y alteraciones de diversa índole en la descendencia, entre ellos los efectos que provocan sobre la función reproductiva de la descendencia femenina. En este contexto, se ha caracterizado que ratas hijas de madres obesas presentan un inicio precoz de la pubertad o una maduración sexual temprana (12, 13) con alteraciones de la ciclicidad estral (14) y del desarrollo folicular ovárico, lo que implica un aumento de los quistes ováricos (12). Nuestro grupo demostró que un aumento en los niveles de estradiol sérico desde el nacimiento hasta la edad adulta es probablemente

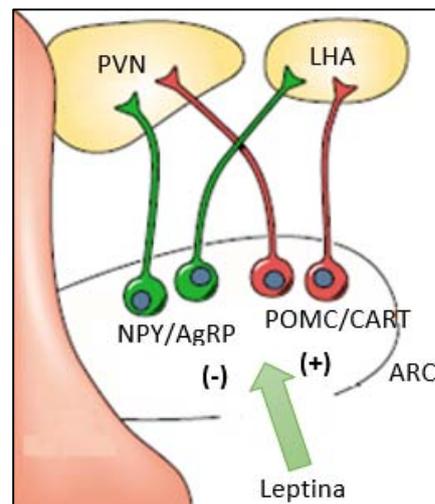
la causa del adelanto de la pubertad, las alteraciones en el desarrollo folicular y la presencia de quistes ováricos en la descendencia de madres obesas (12).

Asimismo, estudios en roedores con obesidad gestacional, demostraron que en las crías se presentaba hiperfagia, aumento de la masa grasa abdominal, hipertensión en la adultez (15), aumento del riesgo de sufrir obesidad (16), hiperleptinemia e hiperinsulinemia, independiente de la dieta posterior al destete (17).

Leptina.

La leptina es una hormona producida principalmente por el tejido adiposo y su producción es directamente proporcional a la cantidad de grasa corporal. Esta hormona se encarga de la regulación del balance energético, inhibiendo la ingesta de alimentos e incrementando el gasto metabólico mediante su acción a nivel hipotalámico, en donde activa el sistema simpático (18, 19). La leptina logra la mayoría de sus efectos metabólicos por la interacción con receptores localizados en regiones del sistema nervioso central, tales como núcleo paraventricular (PVN), el hipotálamo dorsomedial (DMH), hipotálamo ventromedial (VMH), hipotálamo lateral (LH) y el núcleo arcuato, encontrándose en este último la mayor concentración de su receptor en la isoforma Ob-Rb que media la mayoría de los efectos.(20, 21). La interacción de la leptina con su receptor de tipo tirosina quinasa a nivel hipotalámico activa la kinasa JAK, la que a su vez fosforila factores de transcripción de la familia STAT, los cuales son factores de transcripción que se dirigen al núcleo para modular la expresión génica (22, 23). La leptina a través de esta señalización inhibe la expresión de neuropéptidos orexígenos, entre ellos el neuropéptido Y (NPY) y el péptido

relacionado con la proteína agouti (AgRP) (24); y estimula la expresión y liberación elementos anorexígenos por medio de molécula precursora pro-*opiomelanocortina* (POMC): hormona estimuladora de los melanocitos (α MSH) y el transcrito regulado por cocaína-anfetaminas (CART) (25), de esta forma por medio de la unión de α MSH al receptor 4 de melanocortinas (MC4-R) incrementa el gasto energético y AgRP promueve la saciedad (19, 26) (Figura 1).



Leptina media la activación del sistema

simpático en hipotálamo.

La relación entre la leptina y la activación del

Figura 1. Esquema mecanismo de acción de la leptina en hipotálamo.

sistema simpático (SNS) aún está siendo estudiada, y cada día toma mayor relevancia, debido a que existe una correlación significativa entre la presión arterial y las concentraciones de leptina en plasma de pacientes con hipertensión esencial (27).

En roedores, se ha observado que la leptina ejerce influencias sobre la función cardiovascular y renal que son mediadas a través del SNS (28). Diversos estudios demuestran que la administración intracerebroventricular (ICV) de leptina en ratas aumenta la presión arterial media, la frecuencia cardiaca, la actividad simpática renal y lumbar (29, 30), efectos que se encuentran ausentes en ratas que poseen mutado el receptor de leptina, lo que indica que este efecto de activación simpática se encuentra mediado por el receptor

de leptina (28), además el que inyecciones ICV produzcan tales efectos, sugiere que leptina activa el sistema simpático principalmente a nivel de mecanismo central (31, 32).

La obesidad gestacional se ha relacionado con una alteración en el correcto funcionamiento de la leptina en la regulación de la ingesta y la capacidad de sobre activar el SNS a nivel central (33, 34). La descendencia de madres con obesidad inducida por la dieta presenta hiperfagia, hiperleptinemia y una expresión aumentada de esta en tejido adiposo (16). Sin embargo, presentan una hipersensibilidad a la activación del sistema simpático inducido por la hormona Leptina y con ello una mayor sensibilidad a los efectos cardiovasculares como la hipertensión (35, 36).

Regulación nerviosa simpática del ovario.

La activación del sistema simpático que estaría mediada por el aumento de leptina tal vez no solo posee efectos a nivel cardiovascular sino también podría tener efectos a nivel reproductivo. Se conoce que en mamíferos el ovario posee una regulación hormonal hipotálamo- pituitaria y una regulación nerviosa paralela dada principalmente por proyecciones nerviosas simpáticas que se encuentran conectadas sinápticamente desde el PVN del hipotálamo, proyectándose por el tronco encefálico hacia su último relevo sináptico en el ganglio celiaco (37, 38). Es por ello que el ovario posee elementos involucrados en la acción simpática mediada por el neurotransmisor noradrenalina, como lo son las enzimas que participan en la biosíntesis de noradrenalina (NA), la presencia del mismo neurotransmisor en el tejido, capacidad para liberar la NA y también receptores adrenérgicos (37). En la figura 2 se resume el control hormonal y nervioso del ovario.

El efecto del SNS sobre el ovario se encuentra mediado por receptores beta adrenérgicos que se expresan en los folículos ováricos (39), siendo el principal β_2 . La activación de estos receptores adrenérgicos favorece los efectos de las gonadotropinas sobre el desarrollo folicular y aumento de la expresión del receptor de la hormona folículo estimulante (FSH) (40) y la secreción de esteroides (41).

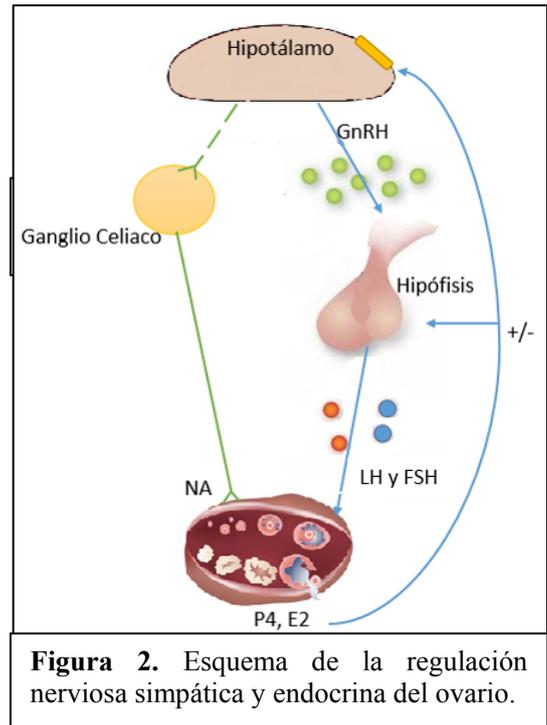


Figura 2. Esquema de la regulación nerviosa simpática y endocrina del ovario.

Se ha observado en ratas que la inervación simpática en el ovario se desarrolla durante los primeros días de vida y que participa activamente en el desarrollo folicular (40, 42). Por tanto, una alteración en la regulación nerviosa del ovario en etapas tempranas puede afectar la funcionalidad ovárica en la adultez.

Por otro lado, la inervación simpática se ve implicada en patologías a nivel reproductivo, como lo es el síndrome de ovario poliquístico (PCOS) (43), patología que también se ha observado en la descendencia de madres de obesas (12).

Modulación simpática sobre el tejido adiposo.

La leptina modula el almacenamiento y utilización de los lípidos periféricos en tejido adiposo, y es en este sentido que se ha descrito que la administración de leptina ICV inhibe la síntesis de lípidos en tejido adiposo (44). Esta acción sobre el metabolismo de los

adipocitos puede ser mediada por la activación del SNS a nivel central que posee proyecciones nerviosas al tejido adiposo y media su efecto por el neurotransmisor NA (45, 46).

El origen de las proyecciones nerviosas que inervan el tejido adiposo se encuentran principalmente en el hipotálamo. Utilizando un trazador viral retrogrado para estudiar principalmente la inervación del tejido adiposo blanco inguinal, se encontraron neuronas marcadas en el locus coeruleus, en núcleos hipotalámicos como lo son el ARC, DMH, VMH y LHA, además de algunas regiones del proencéfalo (47).

Los adipocitos diferenciados cuentan con receptores β_3 adrenérgicos acoplado a proteína Gs (48), que al ser estimulados inhiben la lipogénesis, activan la lipólisis e inhiben la secreción de leptina a través de la proteína quinasa A (PKA) que activa la lipasa sensible a hormonas desde el tejido adiposo (48, 49).

El rol del SNS en la modulación del tejido adiposo juega un papel importante en la obesidad. Se ha evidenciado que la denervación del SNS sobre el tejido adiposo, resulta en un aumento de la masa grasa (50). Una alteración simpática en tejido adiposo podría estar involucrada en la reducción de la lipólisis presentada en individuos obesos. Altos niveles de catecolaminas en adipocitos podría inducir una disminución de los receptores adrenérgicos que participan en la activación de la lipólisis (51), por otro lado, el aumento de citoquinas inflamatorias presentes en la obesidad, puede también participar en la disminución de la síntesis de receptores β_3 adrenérgicos o en la desensibilización de estos mismos (52).

En resumen, dada la evidencia del rol que cumple el SNS sobre diversos tejidos periféricos, tales como el tejido adiposo y el ovario, es que la hiperleptinemia podría estar implicada en las alteraciones al correcto funcionamiento reproductivo y metabólico por medio de su capacidad hormonal como regulador del SNS a nivel hipotalámico (Figura 3).

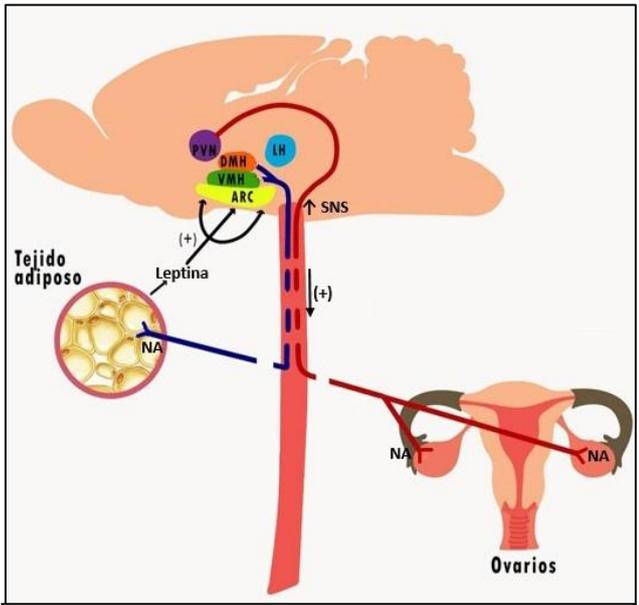


Figura 3. Esquema de la activación de núcleos hipotalámicos que regulan simpáticamente el ovario y tejido adiposo.

HIPÓTESIS

La obesidad materna inducida por el consumo de una dieta alta en grasa previo, durante la preñez y lactancia se asocia a niveles elevados de leptina sérica y una alteración simpática a nivel ovárico y en el tejido adiposo blanco retroperitoneal en ratas adultas descendientes.

OBJETIVOS

General:

Evaluar la relación entre los niveles séricos de leptina y el contenido de noradrenalina ovárica y en tejido adiposo en la descendencia adulta de ratas obesas.

Específicos:

1. Determinar los niveles séricos de leptina en ratas hijas de madres obesas y controles mediante ELISA no competitivo.
2. Medir la expresión génica de leptina (*Lep*) en tejido adiposo de ratas hijas de madres obesas y controles mediante PCR en tiempo real.
3. Determinar los niveles de noradrenalina en el ovario mediante HPLC-EC y en grasa por ELISA no competitivo en ratas hijas de madres obesas y controles.
4. Determinar la expresión génica de los receptores adrenérgicos β_2 adrenérgico (*Adrb2*) en el ovario y β_3 (*Adrb3*) en el tejido adiposo de ratas hijas de madres obesas y controles mediante PCR en tiempo real.

METODOLOGÍA

Tipo de estudio.

Estudio analítico experimental longitudinal retrospectivo.

Animales.

Ratas de la cepa Sprague Dawley de 200-250g de peso y su descendencia femenina en etapa adulta (60 días de vida).

Variables:

Independientes	Dependientes
Alimento HF	Noradrenalina (fmol/mg de ovario y ng/mg de tejido adiposo)
	Leptina plasmática (ng/ml)
Alimento Control	Niveles del ARNm del gen <i>Lep</i> en tejido graso
	Niveles del ARNm del gen <i>Adrb2</i> en ovario y <i>Adrb3</i> en tejido adiposo

HF: High Fat; ARNm: ácido ribonucleico mensajero

Todas las variables a estudiar son cuantitativas continuas

Diseño experimental.

Se utilizaron tejidos de crías hembras de madres obesas, extraídos de la serie experimental de la tesis de pregrado de las Nutricionistas Daniela Álvarez y Sofía Olguín realizada en el laboratorio de Alteraciones Reproductivas y Metabólicas del Instituto de

Fisiología de la Universidad de Valparaíso. El diseño experimental utilizado en la tesis mencionada fue el siguiente:

13 Ratas de la cepa Sprague Dawley se separaron en dos grupos experimentales: 8 ratas con dieta control (Dieta Champion: 23% Proteína, 64% Hidratos de Carbono, 13% Lípidos, equivalentes a 4 Kcal/g) y 5 ratas con dieta alta en grasa (High Fat: 18% Proteína, 20% Hidratos de Carbono y 62% Lípidos, equivalentes a 5 Kcal/g). Los animales permanecieron en el bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso con acceso a agua y comida *ad libitum*, en una sala con temperatura controlada y con ciclo día-noche de 12 horas. Las primeras 2 semanas ambos grupos fueron expuestos a dieta control (periodo de aclimatación) y se mantuvo un permanente control del peso corporal, ingesta alimentaria y ciclicidad estral. Al culminar el periodo de aclimatación ambos grupos comenzaron con su dieta correspondiente, conservándola desde el periodo de cruce hasta el destete en el día post natal (PND) 21. El periodo de cruce fue luego de 4 semanas iniciada la dieta con machos reproductores expuestos a dieta control. La preñez se confirmó por medio de la observación de espermatozoides en el canal vaginal o de ocho diestros consecutivos. Desde el PND 1 las crías fueron sexadas y mantenidas con sus respectivas madres hasta el destete, en donde fueron separadas y alimentadas con dieta control *ad libitum*. Las crías fueron eutanasiadas en el estro más cercano al PND 60 luego de 6 hrs de ayuno. En la presente tesis se utilizarán los tejidos extraídos de las crías eutanasiadas al día 60 de edad, en donde se recolectó sangre, ovario, hígado y tejido adiposo retroperitoneal. Los procedimientos de eutanasia de los animales de experimentación fueron realizados por personal capacitado en bioética y manejo de animales de experimentación. Todos los

procedimientos experimentales 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).

Homogenización de tejido ovárico y adiposo para medición de NA.

Se utilizaron ovarios y tejido adiposo retroperitoneal almacenados a -80°C para el ensayo de determinación del contenido de NA y cuantificación de proteínas. Ambos tejidos se pesaron antes de ser homogenizados. La homogenización fue llevada a cabo en ácido perclórico 0.2 N para el ovario y el tejido adiposo en un buffer compuesto por: ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, metabisulfito de sodio 4 mM y ácido clorhídrico 0.01 N. Los homogenizados fueron centrifugados a 12.000 g por 10 min a 4°C . Los sobrenadantes obtenidos de ovarios fueron separado y filtrados (Filtro de $0,2\ \mu\text{m}$, Cole-Parmer HPLC) para ser usado en la determinación del contenido de NA por HPLC-EC.

El precipitado de ambos tejidos fue disuelto en Hidróxido de Sodio 1N por agitación y calor (cada 5 min por 30 min a 60°C) para la cuantificación de proteínas totales.

Cuantificación de Proteínas

La cuantificación de proteínas fue llevada a cabo mediante el método de Bradford, utilizando el kit Bio-Rad Protein Assay (Coomassie Brilliant Blue G-250) como colorante de unión a proteínas. La medición se realizó en un espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm.

Los resultados fueron comparados con una curva estándar preparada a partir de albúmina de suero bovino (BSA, Santa Cruz Biotechnology).

Determinación de noradrenalina por cromatografía líquida de alta precisión acoplado a detección electroquímica (HPLC-EC).

Diez microlitros del sobrenadante obtenido del homogeneizado de ovario fueron inyectados en un sistema de cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un detector electroquímico (HPLC-EC) con la siguiente configuración: Inyector Rheodyne, una bomba isocrática (Modelo PU-2080 Plus, Jasco Co. Ltd., Tokyo, Japan), una columna C18 (Modelo MF-8912, BAS, West Lafayette, IN, USA) y un detector electroquímico (Modelo LC-4C, BAS, West Lafayette, IN, USA) configurado a un potencial de oxidación de 650 mV y una sensibilidad de 1 nA. La fase móvil que se utilizó para la determinación de NA que fue bombeada a un flujo de 0,04 mL/min y estaba compuesta por: 100 mM de NaH₂PO₄, 1,5 mM de decan sulfónico, 1 mM de EDTA, y 3% v/v de acetonitrilo. El área bajo la curva de NA en las muestras fueron comparadas con estándares de referencia y se calcularon las concentraciones de NA usando una curva de calibrado realizada en un programa cromatográfico (Program ChromPass, Jasco Co. Ltd., Tokyo, Japan). Una vez obtenidos los valores de cantidad de NA, estos fueron normalizados por la cantidad de proteínas en cada una de las muestras.

Determinación de leptina sérica y NA en tejido adiposo por ELISA.

Se determinó la concentración de leptina en el suero y NA en tejido adiposo retroperitoneal de las crías mediante el análisis de las muestras obtenidas al día posnatal 60. Para ello se utilizaron kits comerciales de determinación por ELISA. Los procedimientos se realizaron de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes: EMD Millipore, USA, para leptina y ImmuSmol, Francia, para NA.

Determinación de expresión génica de *Lep*, *Adrb2* en tejido adiposo y *Adrb3* en ovario por PCR en tiempo real.

En el análisis de expresión génica por PCR se utilizó ADNc sintetizado a partir del ARN extraído de las muestras de ovario o tejido adiposo retroperitoneal de las crías al PDN60. La extracción de ARN total se realizó con el kit E.Z.N.A.® Total ARN Kit I (OMEGA BIO-TEK, Cat. R6834-02CH) para ovario y Trizol para tejido adiposo. Luego, mediante la técnica de transcripción reversa (RT-PCR) se sintetizó ADN utilizando la enzima SuperScript II (Invitrogen, Cat. 18064-014), random primers (Invitrogen, Cat. 48190-011) e inhibidor de ARNasa (RNase OUT, Invitrogen, Cat. 10777-019). Posteriormente este se amplificó mediante la PCR en tiempo real en presencia de partidores específicos para cada uno de los genes de interés. Los productos amplificados fueron detectados con SyberGreen (Agilent Technologies, USA) y se determinó la especificidad de cada amplificado con un análisis de curva melting para cada muestra. Los datos fueron normalizados por el gen constitutivo 18S.

Partidor	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')
<i>Lep</i>	TCC TAT CTG TCC TAT GTT CAA GCT GTG	CAA CTG TTG AAG AAT GTC CTG CAG AGA
<i>Adrb2</i>	GTT ATC GTC CTG GCC ATC GT	AAG TCC AGA ACT CGC ACC AG
<i>Adrb3</i>	TAG CAA GGA GCC TGA CTT CTG	TTG GTT CTG GAG AGT TGC GG
<i>Rn 18s</i>	TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG	GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA

Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism® versión 6.01. Los resultados son expresados como el promedio \pm error estándar de la media (EEM). Para evidenciar la distribución de las variables en estudio se utilizó el test de normalidad D'Agostino-Pearson. Si las variables tienen una distribución normal se utilizó el prueba T-Student para comparación de las medias y en el caso de que la distribución sea no paramétrica se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Se estableció el nivel de significancia a un valor de $p < 0,05$ para indicar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

RESULTADOS

1. Niveles séricos de leptina en ratas descendientes de madres obesas comparadas con ratas controles a los 60 días de edad.

En la Figura 4 se muestran los niveles séricos de leptina al día post natal 60 en ratas controles en comparación a ratas descendientes de madres obesas. Se observó que las hijas de madres obesas (n= 9) poseen una tendencia al aumento de los niveles leptina sérica (p= 0.0855) con respecto a las crías de madres control (n= 8).

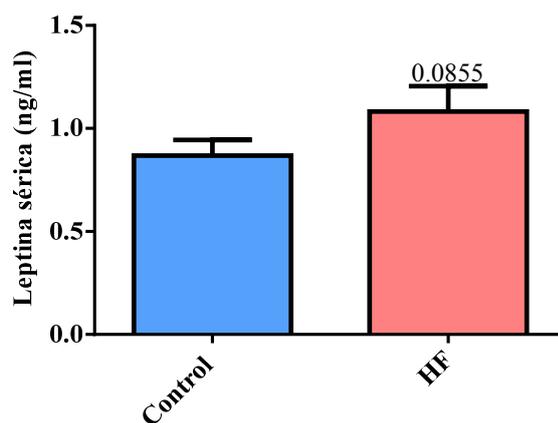


Figura 4. Niveles séricos de leptina. El gráfico muestra los niveles séricos del leptina en ng/ml en las ratas hijas del grupo Control y HF al PND 60. Los resultados se expresan como la media + EEM. *p< 0.05 por T-Student

2. Niveles de expresión génica de *Lep* en tejido adiposo de ratas descendientes de madres obesas comparadas con ratas controles a los 60 días de edad.

La Figura 5 muestra los niveles de expresión génica de *Lep* en tejido adiposo en ratas controles en comparación a ratas descendientes de madres obesas al día post natal 60. Se observó que hijas de madres obesas (n= 13) no poseen diferencias en la expresión del gen que codifica para leptina en comparación con las hijas control (n= 10).

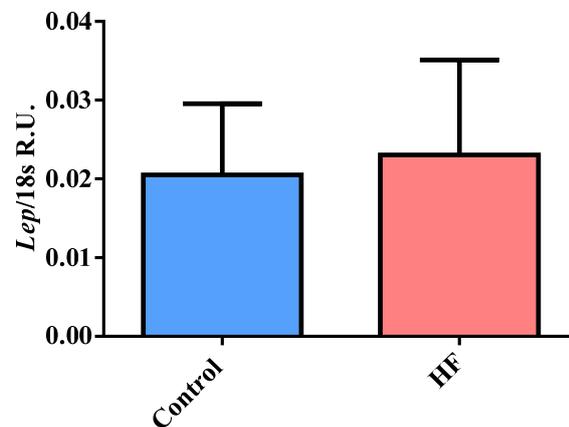


Figura 5. Niveles de la expresión génica de *Lep*. El gráfico muestra los niveles del gen que codifica para leptina (*Lep*) en tejido adiposo retroperitoneal en ratas hijas del grupo Control y HF al PND 60. Los resultados se expresan como la media + EEM. * $p < 0.05$ T- Student.

3. Niveles de Noradrenalina en ovario y tejido adiposo en ratas descendiente de madres obesas comparadas con controles a los 60 días de edad.

En la Figura 6 se muestran los niveles de NA en el ovario (Figura 6A) y en el tejido adiposo retroperitoneal en ratas descendientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa, en comparación con ratas control al día 60 de vida (Figura 6B). Se observó que las hijas de madres tratadas con alimento HF (n= 8) presentaban niveles elevados de NA en el ovario en comparación con las hijas de madres que consumieron alimento control (n= 7). Sin embargo, en el tejido adiposo retroperitoneal los resultados se invierten en cuanto al contenido de NA, presentándose una tendencia a la baja de los niveles de NA (p= 0.0712) en la descendencia de madres tratadas con alimento HF (n= 5) respecto a la descendencia de madres controles (n= 7).

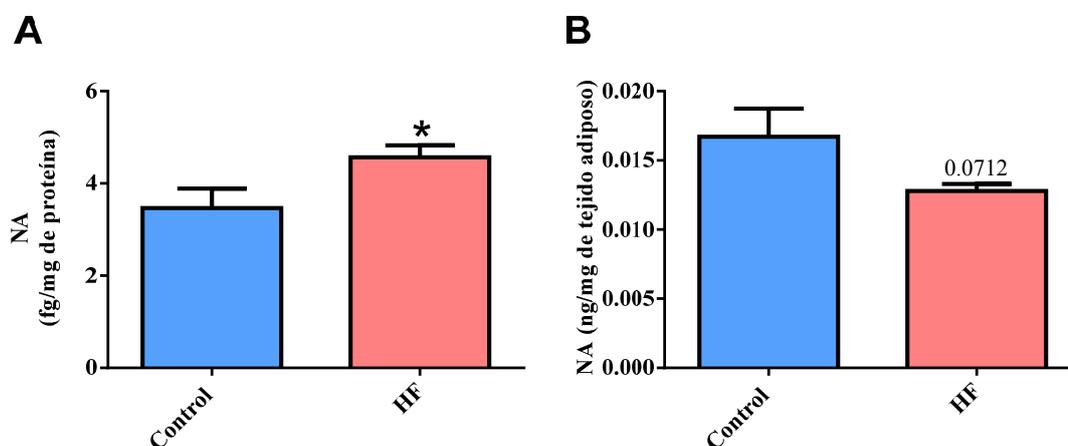


Figura 6. Niveles de noradrenalina ovárica y en tejido adiposo. El gráfico muestra los niveles de noradrenalina en las ratas hijas del grupo Control y HF al PND 60. (A) NA ovárica en fg/mg de proteína. (B) NA en tejido adiposo retroperitoneal en ng/mg de tejido. Los resultados se expresan como la media + EEM. *p<0.05 T-Student.

4. Niveles de expresión génica del *Adrb2* en ovario y *Adrb3* en tejido adiposo de ratas descendientes de madres obesas comparadas con controles a los 60 días de edad.

La Figura 7 muestra los niveles del ARNm del receptor adrenérgico β_2 en el ovario (Figura 7A) y β_3 en el tejido adiposo retroperitoneal (Figura 7B) al día post natal 60. Observamos una expresión aumentada del gen que codifica para el receptor β_2 adrenérgico en ovario en las hijas del grupo HF (n= 6) en comparación con las hijas del grupo control (n= 6). Por otro lado, en tejido adiposo no se apreciaron diferencias de los niveles de ARNm del receptor β_3 adrenérgico entre las hijas del grupo HF (n= 10) y control (n= 12).

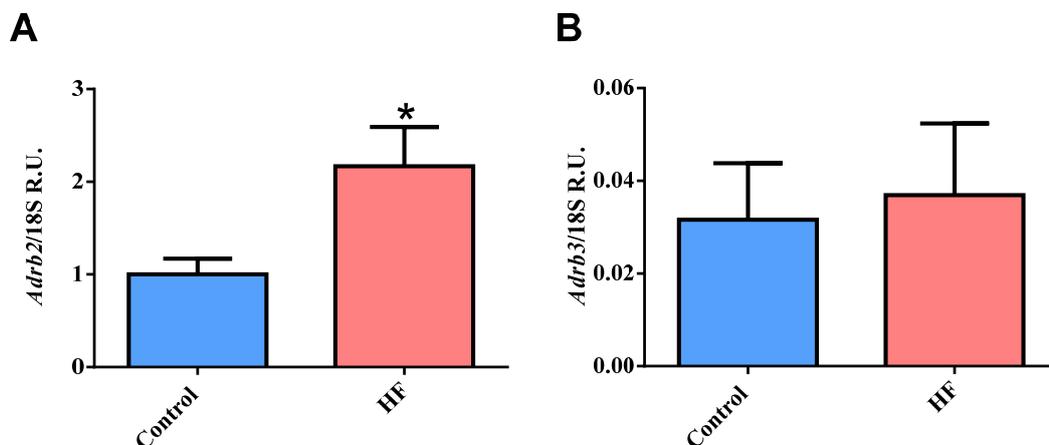


Figura 7. Niveles de la expresión génica *Adrb2* en ovario y *Adrb3* en tejido adiposo retroperitoneal. El gráfico representa la expresión del gen para receptores adrenérgicos principales en ovario y tejido adiposo retroperitoneal en ratas hijas del grupo Control y HF al PND 60. (A) Niveles del gen que codifica para el receptor β_2 (*Adrb2*) en ovario. (B) Niveles del gen que codifica para el receptor β_3 (*Adrb3*) en tejido adiposo retroperitoneal. Los resultados se expresan como la media + EEM. * $p < 0.05$. T-Student.

DISCUSIÓN

Los resultados indican que la obesidad gestacional provoca una alteración simpática a nivel ovárico en la descendencia femenina que se prolongan hasta la adultez. El presente estudio demostró que hijas de ratas con obesidad inducida por la administración de una dieta alta en grasa (HF), presentan una sobre activación del sistema nervioso simpático (SNS) a nivel ovárico en la descendencia adulta, pero este perfil no se observa en tejido adiposo. Esta alteración simpática presentada en ovario podría estar modulada por un aumento en los niveles séricos de leptina y su capacidad de activar el SNS a nivel central.

Diversos trabajos que estudian los efectos de la obesidad gestacional sobre la descendencia, dan cuenta de niveles elevado de leptina en el suero de hijas de ratas HF desde los primeros días de vida (15, 34). Sin embargo, en nuestro estudio, las hijas de ratas HF no presentan un aumento significativo de los niveles séricos de leptina, solo una tendencia, (Figura 4) y la expresión del ARNm de la hormona en cuestión (Figura 5) se encuentra sin diferencias respecto a las hijas de madres control en el tejido adiposo. Creemos que estos resultados inesperados pueden deberse al diseño experimental utilizado, ya que la descendencia fue sometida a 6 horas de ayuno antes de la recolección del plasma y tejidos. El ayuno regula la secreción de la leptina por medio del aumento de AMPc intracelular y descenso de insulina sérica, de esta forma provoca una disminución de la expresión génica de leptina e inhibe su liberación desde tejido adiposo (53), más aún el efecto del ayuno sobre la regulación de la secreción leptina se encuentra exacerbado en individuos obesos en comparación con normopesos que son expuestos a periodos de ayunos (54).

Obesidad gestacional, leptina y activación sistema simpático

Las ratas madres expuestas en dieta HF presentaron mayor peso corporal pre-concepcional comparado con ratas controles (Anexo 3). Se ha descrito que la obesidad gestacional influye en los niveles de leptina sérica presentada en la descendencia desde etapas tempranas de la vida (34). La exposición a una dieta alta en grasa en útero conduce a modificaciones epigenéticas del gen que codifica para leptina en la descendencia. Una mayor metilación del ADN en la región promotora del gen que codifica para leptina se relaciona con un aumento de los niveles séricos de leptina y su expresión en adipocitos de hijos de madres obesas (55), dando como consecuencia una hiperleptinemia que se ha asociado con la capacidad de activar el sistema nervioso simpático sobre los niveles basales, a pesar de presentar resistencia a la leptina (15, 34).

La sobre activación simpática y resistencia a la leptina sería provocada por la misma leptina en la etapa neonatal. Cabe destacar que en nuestro estudio, las hijas de madres HF presentan un mayor peso corporal comparado con ratas controles desde el día post natal (Anexo 4), por lo cual podríamos pensar que las hijas de madres HF presentan niveles elevados de leptina desde los primeros días de vida post natal y es en este periodo en donde la hormona participa en el desarrollo neurotrófico del cerebro, principalmente en el desarrollo de las proyecciones del ARC a los núcleos DMH, PVH y al LHA. Cada una de estas proyecciones se encuentran implicadas en regulación de la ingesta de alimentos en el hipotálamo (56, 57). Fisiológicamente en la etapa neonatal, leptina no es capaz de ejercer su efecto sobre la ingesta de alimento debido a la inmadurez del hipotálamo, es por ello que existe un alto consumo de alimento con elevados niveles de leptina sérica, de esta forma se

asegura un rápido crecimiento en los primeros días de vida (58). En este contexto, niveles alterados de leptina en la etapa neonatal actuarían como modulador, afectando el correcto desarrollo (59) hipotalámico en una ventana crítica del desarrollo, programando a nivel hipotalámico una resistencia a la leptina y la capacidad de sobre activar el SNS (60).

Durante los últimos años se ha demostrado que la resistencia a la leptina presentada en individuos obesos es selectiva. Experimentos midieron la activación inducida por leptina de neuronas del hipotálamo rastreando la cascada de fosforilación desencadenada al unirse a su receptor, demostrándose que leptina activa neuronas del ARC, VMH y LHA (61) pero esta señalización (Vía JAK/STAT) disminuye en el ARC de ratones con obesidad inducida por la dieta y en la descendencia de madres obesas (35, 62), atenuando el efecto supresor de la leptina sobre el apetito. Sin embargo, estos ratones presentan una hipersensibilidad a la activación del SNS inducido por la hormona leptina (35, 36), lo que indica que la activación simpática a nivel hipotalámico no implica principalmente al ARC.

Por otro lado, los mecanismos que median la activación simpática en la obesidad o en la resistencia a la leptina son independientes de la señalización de STAT. Los elementos involucrados en la activación del SNS son 2:

- 1) La fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) activada por la estimulación del receptor de leptina (45, 63), ya que el bloqueo de la PI3K inhibe la respuesta simpática modulada por la leptina (63).
- 2) El receptor 4 de melanocortina (MC4-R) ubicado en los núcleos hipotalámicos, ya que su bloqueo también inhibe la activación del SNS (64).

Los niveles elevados de leptina en el periodo neonatal afectarían la modulación de uno de los dos elementos involucrados en la activación de del SNS, específicamente la expresión del MC4-R. Se ha notificado que la descendencia de madres obesas que cursan con hiperleptinemia durante los primeros días de vida presentan una mayor expresión MC4-R en hipotálamo y con ello una mayor activación del SNS (65), mecanismo por el cual estaría mediado las alteraciones presentadas en hijos de madres obesas. La Figura 10 resume el mecanismo por el cual la obesidad gestacional altera la función a nivel hipotalámico en la descendencia.

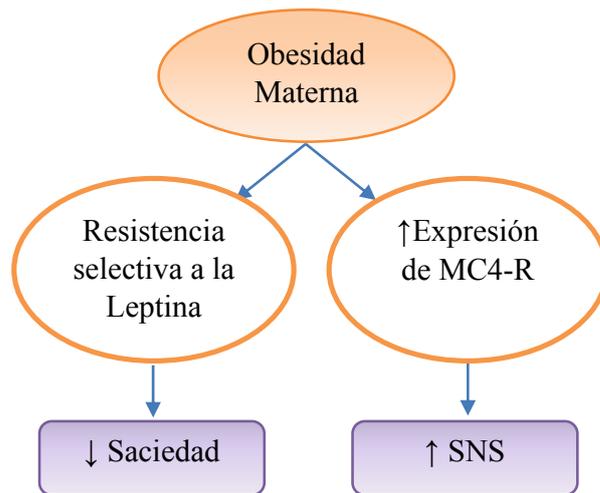


Figura 8. Esquema programación fetal en obesidad gestacional.

Descendencia (Hipotálamo)

Alteración simpática en la regulación ovárica.

El ovario presenta una regulación nerviosa dada por el sistema simpático, siendo el PVN el núcleo principal del hipotálamo implicado en la activación de las neuronas que se proyectan al ovario. Este núcleo presenta una mayor expresión del MC4-R y activación debido a la programación dada por los elevados niveles de leptina presentados en el periodo neonatal de la descendencia de madres que sufrieron obesidad gestacional (65). En este sentido confirmamos que las hijas de madres obesas presentan un mayor contenido de noradrenalina a nivel ovárico en la adultez, siendo nuestro estudio la primera evidencia de este hallazgo (Figura 6A). Esta alteración simpática a nivel ovárico puede conducir a efectos adversos en la función reproductiva, de hecho, nuestro grupo observó una elevada presencia de quistes foliculares en los ovarios de la descendencia de ratas HF estudiadas en este trabajo (66). Resultados similares a los descritos en ratas sometidas a estrés en donde se ha observado que un aumento de la actividad simpática en el ovario conduce a cambios en el desarrollo folicular con aparición de quistes ováricos que se asocian a un estado de hiperandrogenismo (67). El aumento anormal de NA en ovario o la exposición a agonistas del receptor β_2 -adrenérgico, afecta el crecimiento folicular. Además la síntesis de andrógenos se relaciona con la disminución de folículos secundarios (68) y aparición de folículos con hipertrofia de las células de la teca que producen una hipersecreción de andrógenos que contribuyen a la formación de quistes foliculares (69). Nuestros resultados muestran que las ratas hijas de madre obesas presentan una mayor expresión génica receptor adrenérgico β_2 (Figura 7A), lo que podría estar correlacionado con un aumento en

el tamaño de los folículos ováricos (70) o incluso con una mayor presencia de estos receptores en los quistes foliculares.

Por lo tanto, un elevado contenido de NA y expresión génica de su receptor en el ovario durante etapas tempranas de la vida aumenta el crecimiento y reclutamiento folicular, elevando la probabilidad de que un número mayor de folículos pasen a formar quistes, provocando alteraciones en la función reproductiva que perpetúan hasta la adultez

El tejido adiposo presenta una disminución del tono simpático.

Uno de los resultados interesantes de este trabajo fue observar si las alteraciones provocadas al sistema simpático afectan la regulación del tejido adiposo. En nuestros resultados, las hijas de ratas obesas presentaron una tendencia a la disminución en los niveles de noradrenalina en tejido adiposo retroperitoneal (Figura 6B) y una tendencia al aumento de la leptina (Figura 4). Considerando que el sistema simpático a través de su neurotransmisor noradrenalina inhibe la liberación de leptina (48) y que actúa de forma catabólica activando la lipólisis (45), en individuos con sobre activación simpática esperaríamos encontrar niveles disminuidos de leptina y mayor catabolismo lipídico. Sin embargo, nuestros resultados muestran una relación inversa. Estas diferencias podrían ser explicadas por el tipo de tejido adiposo utilizado en este estudio, debido a que la inervación nerviosa simpática en depósitos grasos es diferencial (47), es decir, presenta distintos núcleos hipotalámicos de salida del SNS según la funcionalidad, disposición anatómica y tipo de tejido adiposo. Dentro de este contexto, se ha estudiado en hámster siberiano, que el flujo del SNS al tejido adiposo retroperitoneal parece involucrar más neuronas de los

núcleos supraquiasmáticos y el tracto solitario que núcleos hipotalámicos (71), por otro lado, aún faltan estudios acerca de participación del MC4-R en activación simpática del tejido adiposo retroperitoneal, ya que la inyección de un agonista del MC4-R no incrementa la niveles de NA en el tejido adiposo retroperitoneal (72).

Dentro de los sistemas que participan en la regulación del tejido adiposo también debemos considerar el sistema endocanabinoide (SEC). Se ha descrito que la exposición a una dieta alta en grasa durante la gestación afecta la expresión y actividad del SEC en la descendencia (73). El SEC participa en la regulación de la ingesta, este sistema posee dos receptores de endocanabinoides, RCB1 y RCB2, ambos receptores acoplados a proteína G, que pueden ser activados por sus ligando anandamina y 2-araquidonilglicerol, sintetizados a partir de fosfolípidos de membrana (74). El SEC aumenta la ingesta de alimentos por medio de la activación hipotalámica de RCB1 (75), receptor que también se encuentra en tejidos periféricos y terminales pre-sinápticas, es en este último sitio en donde la activación de RCB1 se encuentra acoplado a receptor de tipo Gi que puede inhibir la liberación de neurotransmisores como lo es la NA . Se ha evidenciado la participación del SEC en la inhibición del sistema simpático a nivel cardiovascular (76), lo que nos lleva a pensar que podría estar sucediendo también a nivel de tejido adiposo.

En cuanto a los niveles de receptores adrenérgicos β_3 en el tejido adiposo de las hijas de ratas sometidas a alimento HF, no presentan diferencias con ratas controles (Figura 7B). Curiosamente, la obesidad se ha asociado a niveles elevados de catecolaminas que provocaría una regulación a la baja en la expresión de receptores adrenérgicos en tejido adiposo (51), pero este perfil no fue observado en el presente estudio. Por otro lado, el

aumento de la adiposidad en tejido adiposo puede estar dada también por una menor sensibilidad de los receptores adrenérgicos provocada por citoquinas inflamatorias que pueden afectar la señalización del receptor sin afectar la síntesis del mismo. Esta disminución selectiva a la sensibilidad de receptores adrenérgicos en tejido adiposo, también es presentada en mujeres con PCOS sin obesidad (77), por lo cual, el mecanismo que afecta la correcta respuesta de los receptores adrenérgicos puede no solo ser provocada por la obesidad, sino también por las alteraciones reproductivas presentadas en las hijas de madres HF.

En resumen, la obesidad gestacional puede provocar la elevación de los niveles séricos de leptina en la descendencia que se puede evidenciar en la etapa adulta, esto podría conllevar a una sobre activación del sistema simpático a nivel ovárico afectando la función reproductiva. Por otro lado, el tejido adiposo parece ser resistente o insensible a la regulación del SNS sobre su metabolismo, explicando el aumento de la adiposidad en las hijas de ratas sometidas a dieta HF. Estos datos se deben considerar como base para las medidas terapéuticas nutricionales en embarazadas, debemos recordar que las madres expuestas a dieta HF no presentaron en promedio mayor ingesta de alimento e ingesta calórica durante la gestación, sino más bien, fueron expuestas a un alimento de baja calidad nutricional (Anexo 1).

El entendimiento de las alteraciones provocadas por la obesidad gestacional en la descendencia contribuirá para mejorar y fundamentar la aplicación de terapias en el embarazo y posteriormente en la descendencia. Los nuevos desafíos en esta investigación serán ahondar en mejoras de la dietoterapia entregada a la madre en el periodo de

concepción y el efecto de la lactancia materna en la descendencia femenina adulta. Con ello evaluar valuar la disminución o prevención de las alteraciones descritas y de esta forma plantear medidas terapéuticas para prevenir las consecuencias de la obesidad durante la gestación.

CONCLUSIONES

- 1) Los niveles séricos de leptina presentan una tendencia al aumento en hijas de ratas obesas comparadas con controles al día post natal 60.
- 2) La expresión gen *Lep* en tejido adiposo retroperitoneal no presenta diferencias en hijas de ratas obesas comparado con ratas controles al día post natal 60.
- 3) Los niveles de noradrenalina en ovario en hijas de ratas se encuentran elevados, mientras que en tejido adiposo retroperitoneal presentan una tendencia a la disminución comparado con ratas controles al día post natal 60.
- 4) La expresión génica del receptor β_2 adrenérgico en ovario se encuentra elevada en hijas de ratas obesas, mientras que la expresión del receptor β_3 adrenérgico en tejido adiposo retroperitoneal no presenta diferencias en hijas comparado con ratas controles al día post natal 60.

BIBLIOGRAFÍA

1. www.who.int h. Organización Mundial de la Salud. Ultimo acceso: Abril de 2016.
2. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384(9945):766-81.
3. OMS. Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2014. Ediciones OMS. 2014:9-10.
4. Salud Md, Chile Gd. Encuesta Nacional de Salud 2010. 2010.
5. www.deis.cl. Departamento de Estadísticas e Información de Salud, DEIS. Ultimo acceso: Abril de 2016.
6. Cedergren MI. Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. *Obstet Gynecol*. 2004;103(2):219-24.
7. Flenady V, Koopmans L, Middleton P, Froen JF, Smith GC, Gibbons K, et al. Major risk factors for stillbirth in high-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2011;377(9774):1331-40.
8. Catalano PM, Ehrenberg HM. The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. *BJOG*. 2006;113(10):1126-33.
9. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp*. 1991;156:38-50; discussion -5.

10. Sridhar SB, Darbinian J, Ehrlich SF, Markman MA, Gunderson EP, Ferrara A, et al. Maternal gestational weight gain and offspring risk for childhood overweight or obesity. *Am J Obstet Gynecol.* 2014;211(3):259 e1-8.
11. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet.* 1989;2(8663):577-80.
12. Ambrosetti V, Guerra M, Ramirez LA, Reyes A, Alvarez D, Olguin S, et al. Increase in endogenous estradiol in the progeny of obese rats is associated with precocious puberty and altered follicular development in adulthood. *Endocrine.* 2016;53(1):258-70.
13. Sloboda DM, Howie GJ, Pleasants A, Gluckman PD, Vickers MH. Pre- and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat. *PLoS One.* 2009;4(8):e6744.
14. Connor KL, Vickers MH, Beltrand J, Meaney MJ, Sloboda DM. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. *J Physiol.* 2012;590(9):2167-80.
15. Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH, et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension.* 2008;51(2):383-92.
16. Rajia S, Chen H, Morris MJ. Maternal overnutrition impacts offspring adiposity and brain appetite markers-modulation by postweaning diet. *J Neuroendocrinol.* 2010;22(8):905-14.

17. Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol.* 2009;587(Pt 4):905-15.
18. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:413-37.
19. Seeley RJ, Drazen DL, Clegg DJ. The critical role of the melanocortin system in the control of energy balance. *Annu Rev Nutr.* 2004;24:133-49.
20. 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(7):1263-71.
21. Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett.* 1996;387(2-3):113-6.
22. Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, et al. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature.* 2003;421(6925):856-9.
23. Martin SS, Qasim A, Reilly MP. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(15):1201-10.
24. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, et al. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature.* 1995;377(6549):530-2.

25. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 2001;411(6836):480-4.
26. Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci*. 2005;8(5):571-8.
27. Agata J, Masuda A, Takada M, Higashiura K, Murakami H, Miyazaki Y, et al. High plasma immunoreactive leptin level in essential hypertension. *Am J Hypertens*. 1997;10(10 Pt 1):1171-4.
28. Haynes WG. Interaction between leptin and sympathetic nervous system in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2000;2(3):311-8.
29. Shek EW, Brands MW, Hall JE. Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension*. 1998;31(1 Pt 2):409-14.
30. Dunbar JC, Hu Y, Lu H. Intracerebroventricular leptin increases lumbar and renal sympathetic nerve activity and blood pressure in normal rats. *Diabetes*. 1997;46(12):2040-3.
31. Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Numata Y, Tsuji T, Hayase M, et al. Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus: leptin-induced increase in catecholamine secretion. *Diabetes*. 1999;48(9):1787-93.
32. Kalil GZ, Haynes WG. Sympathetic nervous system in obesity-related hypertension: mechanisms and clinical implications. *Hypertens Res*. 2012;35(1):4-16.
33. Samuelsson AM. New perspectives on the origin of hypertension; the role of the hypothalamic melanocortin system. *Exp Physiol*. 2014;99(9):1110-5.

34. Kirk SL, Samuelsson AM, Argenton M, Dhonye H, Kalamatianos T, Poston L, et al. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS One*. 2009;4(6):e5870.
35. Prior LJ, Davern PJ, Burke SL, Lim K, Armitage JA, Head GA. Exposure to a high-fat diet during development alters leptin and ghrelin sensitivity and elevates renal sympathetic nerve activity and arterial pressure in rabbits. *Hypertension*. 2014;63(2):338-45.
36. Samuelsson AM, Morris A, Igosheva N, Kirk SL, Pombo JM, Coen CW, et al. Evidence for sympathetic origins of hypertension in juvenile offspring of obese rats. *Hypertension*. 2010;55(1):76-82.
37. Gerendai I, Kocsis K, Halasz B. Supraspinal connections of the ovary: structural and functional aspects. *Microsc Res Tech*. 2002;59(6):474-83.
38. Lawrence IE, Jr., Burden HW. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec*. 1980;196(1):51-9.
39. Aguado LI, Petrovic SL, Ojeda SR. Ovarian beta-adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology*. 1982;110(4):1124-32.
40. Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*. 1997;138(8):3320-9.
41. Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology*. 1993;133(6):2696-703.

42. Malamed S, Gibney JA, Ojeda SR. Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. *Cell Tissue Res.* 1992;270(1):87-93.
43. Lansdown A, Rees DA. The sympathetic nervous system in polycystic ovary syndrome: a novel therapeutic target? *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012;77(6):791-801.
44. Fruhbeck G, Aguado M, Gomez-Ambrosi J, Martinez JA. Lipolytic effect of in vivo leptin administration on adipocytes of lean and ob/ob mice, but not db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250(1):99-102.
45. Buettner C, Muse ED, Cheng A, Chen L, Scherer T, Poci A, et al. Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nat Med.* 2008;14(6):667-75.
46. Nonogaki K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia.* 2000;43(5):533-49.
47. Bamshad M, Aoki VT, Adkison MG, Warren WS, Bartness TJ. Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am J Physiol.* 1998;275(1 Pt 2):R291-9.
48. Mark AL, Rahmouni K, Correia M, Haynes WG. A leptin-sympathetic-leptin feedback loop: potential implications for regulation of arterial pressure and body fat. *Acta Physiol Scand.* 2003;177(3):345-9.
49. Langin D. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *C R Biol.* 2006;329(8):598-607; discussion 53-5.
50. Youngstrom TG, Bartness TJ. White adipose tissue sympathetic nervous system denervation increases fat pad mass and fat cell number. *Am J Physiol.* 1998;275(5 Pt 2):R1488-93.

51. Lafontan M, Berlan M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res.* 1993;34(7):1057-91.
52. Mowers J, Uhm M, Reilly SM, Simon J, Leto D, Chiang SH, et al. Inflammation produces catecholamine resistance in obesity via activation of PDE3B by the protein kinases IKKepsilon and TBK1. *Elife.* 2013;2:e01119.
53. Szkudelski T. Intracellular mediators in regulation of leptin secretion from adipocytes. *Physiol Res.* 2007;56(5):503-12.
54. Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(9):3419-23.
55. Masuyama H, Hiramatsu Y. Effects of a high-fat diet exposure in utero on the metabolic syndrome-like phenomenon in mouse offspring through epigenetic changes in adipocytokine gene expression. *Endocrinology.* 2012;153(6):2823-30.
56. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci.* 2004;24(11):2797-805.
57. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science.* 2004;304(5667):108-10.
58. Cottrell EC, Cripps RL, Duncan JS, Barrett P, Mercer JG, Herwig A, et al. Developmental changes in hypothalamic leptin receptor: relationship with the postnatal leptin surge and energy balance neuropeptides in the postnatal rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296(3):R631-9.

59. Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, et al. The effect of neonatal leptin treatment on postnatal weight gain in male rats is dependent on maternal nutritional status during pregnancy. *Endocrinology*. 2008;149(4):1906-13.
60. Samuelsson AM, Clark J, Rudyk O, Shattock MJ, Bae SE, South T, et al. Experimental hyperleptinemia in neonatal rats leads to selective leptin responsiveness, hypertension, and altered myocardial function. *Hypertension*. 2013;62(3):627-33.
61. Hubschle T, Thom E, Watson A, Roth J, Klaus S, Meyerhof W. Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. *J Neurosci*. 2001;21(7):2413-24.
62. Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology*. 2004;145(11):4880-9.
63. Morgan DA, Thedens DR, Weiss R, Rahmouni K. Mechanisms mediating renal sympathetic activation to leptin in obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295(6):R1730-6.
64. Rahmouni K, Haynes WG, Morgan DA, Mark AL. Role of melanocortin-4 receptors in mediating renal sympathoactivation to leptin and insulin. *J Neurosci*. 2003;23(14):5998-6004.
65. Samuelsson AM, Mullier A, Blasco NA, Coen CW, Taylor PD, Balthasar N, et al. Evidence of early life programming of the melanocortin-4 receptor in leptin induced hypertension arising from maternal obesity. *Journal of Human Hypertension*. 2015;29:644-5.
66. Alvarez D, Olguin S. Efectos del tratamiento con metformina previo y durante la preñez en ratas madres obesas sobre la función reproductiva de la descendencia femenina

[Tesis para optar al título de Nutricionista Grado académico de Licenciado de Nutrición y Dietética]: Universidad de Valparaíso; 2015.

67. Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, et al. Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech.* 2002;59(6):495-502.

68. Dorfman M, Arancibia S, Fiedler JL, Lara HE. Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat. *Biol Reprod.* 2003;68(6):2038-43.

69. Bernuci MP, Leite CM, Barros P, Kalil B, Leoni GB, Del Bianco-Borges B, et al. Transitory activation of the central and ovarian norepinephrine systems during cold stress-induced polycystic ovary in rats. *J Neuroendocrinol.* 2013;25(1):23-33.

70. Merz C, Saller S, Kunz L, Xu J, Yeoman RR, Ting AY, et al. Expression of the beta-2 adrenergic receptor (ADRB-2) in human and monkey ovarian follicles: a marker of growing follicles? *J Ovarian Res.* 2015;8:8.

71. Bowers RR, Festuccia WT, Song CK, Shi H, Migliorini RH, Bartness TJ. Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286(6):R1167-75.

72. Brito MN, Brito NA, Baro DJ, Song CK, Bartness TJ. Differential activation of the sympathetic innervation of adipose tissues by melanocortin receptor stimulation. *Endocrinology.* 2007;148(11):5339-47.

73. Ramirez-Lopez MT, Arco R, Decara J, Vazquez M, Noemi Blanco R, Alen F, et al. Exposure to a Highly Caloric Palatable Diet during the Perinatal Period Affects the

Expression of the Endogenous Cannabinoid System in the Brain, Liver and Adipose Tissue of Adult Rat Offspring. *PLoS One*. 2016;11(11):e0165432.

74. Valenzuela C, Aguirre C, Castillo V, Ronco AM, Llanos M. [A role for the endocannabinoid system in obesity]. *Rev Med Chil*. 2010;138(5):621-9.

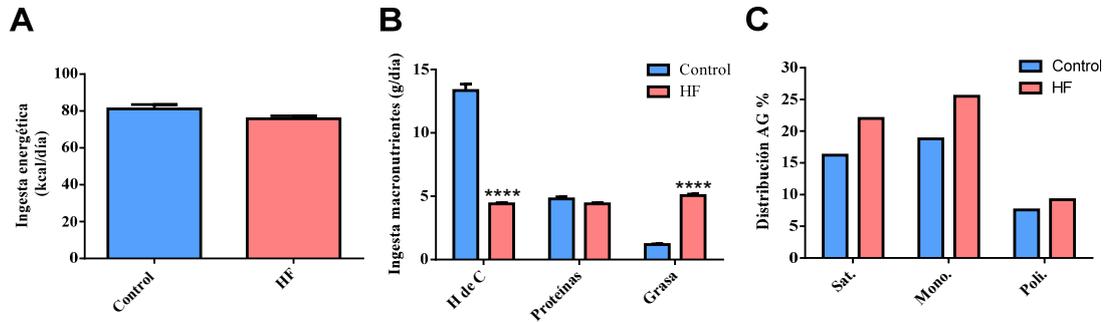
75. Kirkham TC, Williams CM. Endogenous cannabinoids and appetite. *Nutr Res Rev*. 2001;14(1):65-86.

76. Ralevic V, Kendall DA. Cannabinoids inhibit pre- and postjunctionally sympathetic neurotransmission in rat mesenteric arteries. *Eur J Pharmacol*. 2002;444(3):171-81.

77. Faulds G, Ryden M, Ek I, Wahrenberg H, Arner P. Mechanisms behind lipolytic catecholamine resistance of subcutaneous fat cells in the polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(5):2269-73.

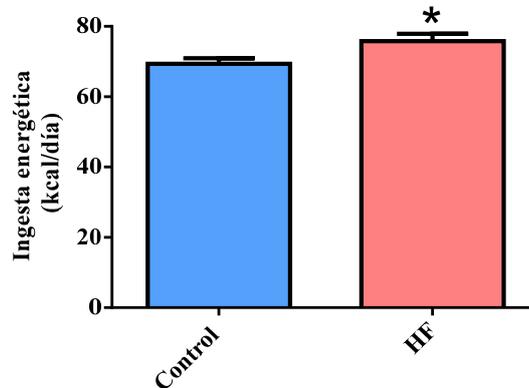
ANEXOS

Anexo 1: Caracterización alimentaria de las madres.



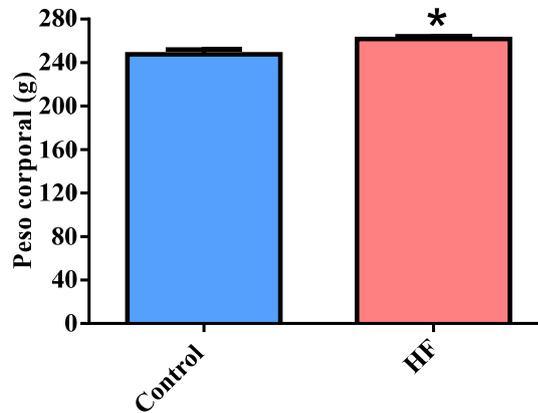
Ingesta energética, de macronutrientes y calidad de las grasas promedio de las madres. (A) Ingesta energética (kcal/día). (B) Ingesta de macronutrientes (g/día). (C) Distribución de los ácidos grasos en dieta HF (g/día). Sat= Saturados, Mono= Mono insaturado, Poli= Poliinsaturados. Los resultados se expresan como el promedio + EEM. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

Anexo 2: Ingesta energética de las madres en pre-concepción.



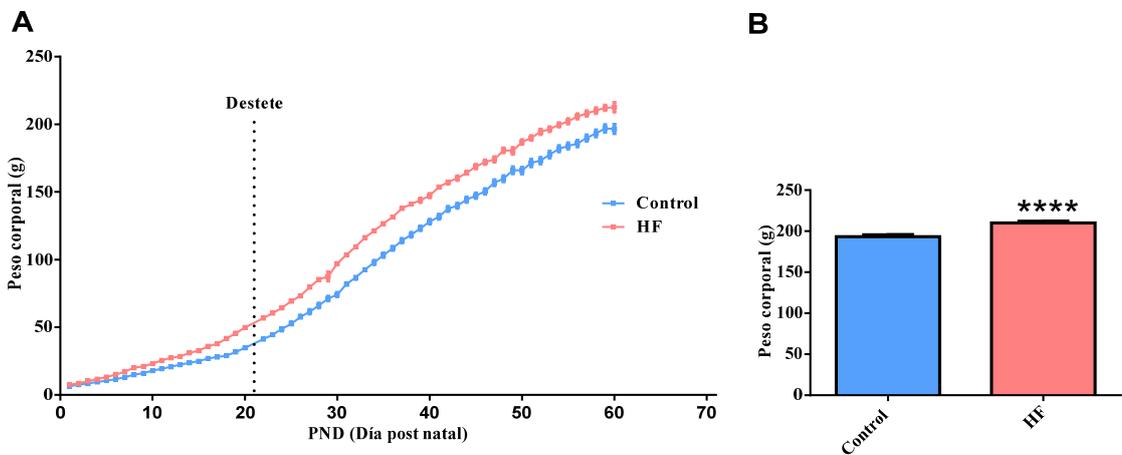
Ingesta energética de las madres. El gráfico muestra las kcal diarias ingeridas por las madres del grupo control y HF durante el periodo de pre-concepción. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. * $p < 0.05$ T-Student.

Anexo 3: Peso corporal de las madres luego en pre-concepción.



Peso corporal en gramos pre-concepcional de las madres . El gráfico muestra el peso corporal de las madres luego de 3 semanas expuestas a dieta control o HF (etapa de pre-concepción). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. * $p < 0.05$ T-Student.

Anexo 4: Peso corporal de las ratas descendientes de madres obesas comparado con ratas controles.



Peso corporal en gramos de la descendencia femenina. El gráfico muestra el peso corporal de las ratas hijas de madres HF comparadas con ratas controles. (A) Peso corporal desde el día post natal 1 al 60. (B) Peso corporal al día post natal 60. Los resultados se expresan como la media + EEM. **** $p < 0.0001$ T-Student.