

**CREIXEMENT RECUPERADOR POSTNATAL
SECUNDARI A RESTRICCIÓ DE PES PRENATAL
EN RATES WISTAR: CANVIS MOLECULARS EN
L'EXPRESSIÓ DELS GENS STK11, DLK1 I SIRT1 EN
ELS TEIXITS ADIPÓS, HEPÀTIC, MUSCULAR I
PLACENTARI**

Gemma Carreras Badosa

Per citar o enllaçar aquest document:
Para citar o enlazar este documento:
Use this url to cite or link to this publication:
<http://hdl.handle.net/10803/369049>



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.ca>

Aquesta obra està subjecta a una llicència Creative Commons Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives licence



TESI DOCTORAL

**CREIXEMENT RECUPERADOR POSTNATAL
SECUNDARI A RESTRICCIÓ DE PES PRENATAL
EN RATES *WISTAR*:
CANVIS MOLECULARS EN L'EXPRESSIÓ
DELS GENS *STK11*, *DLK1* I *SIRT1*
EN ELS TEIXITS ADIPÒS, HEPÀTIC, MUSCULAR
I PLACENTARI**

Gemma Carreras Badosa

2015



TESI DOCTORAL

**CREIXEMENT RECUPERADOR POSTNATAL
SECUNDARI A RESTRICCIÓ DE PES PRENATAL
EN RATES *Wistar*:
CANVIS MOLECULARS EN L'EXPRESSION
DELS GENS *STK11*, *DLK1* I *SIRT1*
EN ELS TEIXITS ADIPÒS, HEPÀTIC, MUSCULAR
I PLACENTARI**

Gemma Carreras Badosa

2015

PROGRAMA DE DOCTORAT

Ciències experimentals i sostenibilitat

Dirigida per:

Dr. Abel López Bermejo

Dra. Judit Bassols Casadevall

Dra. Anna Prats Puig

Memòria per optar al títol de doctora per la Universitat de Girona

AGRAÏMENTS

No sé si moltes persones senten que tenen un trosset d'aquesta tesi, però és ben segur que aquesta tesi té un trosset de moltes persones que, volent o sense voler, i de maneres diferents, hi han contribuït. Intentaré agrair a tothom que m'ha ajudat i acompanyat durant aquests quatre anys.

A l'Abel, per incloure'm dins el seu grup d'investigació i inculcar-me des del primer dia els conceptes de rigor i qualitat en la recerca científica a través de la seva expertesa com a excel·lent investigador sense deixar en cap moment de ser atent i proper.

A la Judit, per vetllar per el bon funcionament del grup i alhora per la meva etapa d'aprenentatge com a doctorant, per encoratjar-me en els moments més feixucs, i per compartir en paral·lel l'assoliment d'aquesta tesi amb l'assoliment de la seva consolidació com a investigadora principal.

A l'Anna, per compartir amb mi tots els seus coneixements de laboratori i d'anàlisi de dades, per les hores braç a braç (que han estat moltes!), i sobretot per mostrar-me dia a dia l'exemple per arribar a ser una bona investigadora.

A tots els altres components del grup: Ferran, Inés, Raquel, Pilar, Estíbaliz, Chema i Alexandra; sense tot l'equip aquests quatre anys no haguessin estat possibles!

A en Xavier, per l'amabilitat de cedir el seu temps i dedicació per ensenyar-me del principi al final com fer experimentació animal, per ajudar-me en tot moment, i per tornar a posar-se la bata per treballar a l'estabulari amb mi.

A tots els companys i companyes de l'IDIBGI, perquè és molt important tenir la tranquil·litat que si et fa falta un cop de mà el tindràs sense ni tan sols demanar-lo. I a la Glòria, per la seva dedicació en les tincions histològiques.

Al grup de Fisiologia Animal de la Universitat de Linköping, en Jordi i la Isa, que durant l'últim any de carrera em van fer veure l'esforç que comportava la investigació bàsica.

Al grup de Neurociències de la Universitat de Girona que em van donar l'oportunitat d'iniciar-me en el món de la recerca: gràcies Gemma i Elisabet.

Al grup de Neurociències de la Universitat d'Euskal Herria i a tots els amics del màster amb els quals vaig compartir un any de classes, pràctiques i sobretot bona companyia. Especialment a la Izaskun i a la Ianire: gràcies per tot.

Als amics, d'aquí i d'allà, tant amb els que ens veiem sovint com amb els que ens veiem en poques ocasions, gràcies per escoltar totes les converses sobre recerca, beques precàries, esperances i il·lusions, experiments fallits i experiments complerts, i a més, posar-hi sempre bona cara.

A la colla d'amics de Biologia que amb els anys ha esdevingut molt més: ara ja som la família UdG. Gràcies a tots per encoratjar-me en tot moment!

Als xerinoles: no sé si les ànimes bessones existeixen però, si ho fan, vosaltres sou les meves.

A tota la família Carreras-Badosa, per preguntar sempre per com m'anaven els estudis i la feina; per escoltar-me i animar-me.

I per damunt de tot, als meus pares, la Rosa i en Miquel, per preocupar-se sempre per el meu present i per el meu futur. Però sobretot per ensenyar-me que amb treball i esforç tot és possible i que, a més a més, amb voluntat i estimació tot és més fàcil. Gràcies de tot cor.

LLISTAT D'ABREVIATURES

ADN	àcid desoxiribonucleic
AMP	adenosina monofosfat
AMPc	3',5'-adenosinmonofosfat cíclic
AMPK	proteïna cinasa activada per AMP
ARN	àcid ribonucleic
AEG	adequat per a l'edat gestacional
ATP	adenosina trifosfat
AKT	proteïna cinasa B
BPN	baix pes al naixement
CRTC2	coactivador transcripcional 2 de CREB
CIR	creixement intrauterí retardat
DLK1	proteïna <i>delta-like</i> 1
DIO3	iodotironina desiodinasa tipus 3
DM2	diabetis mellitus tipus 2
ELISA	assaig per immunoabsorció lligat a enzims
FASN	sintasa d'àcids grassos
HDL	lipoproteïna d'alta densitat (<i>high-density lipoprotein</i>)
HOMA-IR	<i>homeostatic model assesment</i> de resistència a la insulina
HTA	hipertensió arterial
IGF1/2	factor de creixement insulínic tipus 1/tipus 2
IMC	índex de massa corporal
IRS1/2	receptor de la insulina 1/2
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NADFL	malaltia del fetge gras no-alcohòlic
NCEP-ATP III	<i>US national cholesterol education programme – adult treatment panel III</i>

NAD ⁺ /NADH	nicotinamida adenina dinucleòtid
NEFAs	àcids grassos no esterificats
OMS	Organització Mundial de la Salut
PEG	petit per a l'edat gestacional
PKA	proteïna cinasa A
PPARG	<i>peroxisome proliferator-activated</i> receptor gamma
PI3K	fosfatidilinositol 3 cinasa
ROS	espècies oxigen reactives
SM	síndrome metabòlica
SIRT1	sirtuïna 1
STK11	serina-treonina cinasa 11
TA	teixit adipós
TG	triglicèrids
TNF-alfa	factor de necrosis tumoral alfa
TZDs	tiazolidinediones

ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1 Causes i conseqüències de la insulinoresistència en la programació fetal.....	6
Figura 2 Comparació entre l'estructura de la placenta de rata i la placenta humana.....	12
Figura 3 Esquema de la placenta de rata.....	13
Figura 4 Relacions entre la insulina i els teixits adipós, hepàtic i muscular.....	19
Figura 5 Resum de les accions del gen <i>STK11</i> en el metabolisme del teixit adipós, fetge i múscul.....	27
Figura 6 Resum de les accions del gen <i>DLK1</i> en el metabolisme del teixit adipós, fetge i múscul.....	30
Figura 7 Resum de les accions del gen <i>SIRT1</i> en el metabolisme del teixit adipós, fetge i múscul.....	33
Figura 8 Disseny de l'estudi experimental.....	41
Figura 9 Pes corporal de les rates gestants en el model de restricció fetal durant la gestació.....	56
Figura 10 Pes corporal de les cries en el model de creixement recuperador postnatal.....	60
Figura 11 Paràmetres metabòlics de les cries en el model de creixement recuperador postnatal.....	61
Figura 12 Expressió de <i>STK11</i> , <i>DLK1</i> i <i>SIRT1</i> en el teixit adipós retroperitoneal per grups de creixement postnatal.....	63
Figura 13 Concentració de les proteïnes <i>STK11</i> i <i>SIRT1</i> en el teixit adipós retroperitoneal per grups de creixement postnatal.....	63
Figura 14 Morfometria del teixit adipós en els grups de creixement recuperador postnatal.....	64
Figura 15 Correlacions entre l'expressió gènica de <i>STK11</i> i <i>DLK1</i> en el teixit adipós retroperitoneal amb els paràmetres corporals d'estudi en els diferents grups de creixement postnatal.....	66
Figura 16 Correlacions entre l'expressió gènica de <i>STK11</i> , <i>DLK1</i> i concentració de la proteïna <i>SIRT1</i> en el teixit adipós retroperitoneal amb els paràmetres metabòlics d'estudi en els diferents grups de creixement postnatal.....	67
Figura 17 Expressió de <i>STK11</i> i <i>SIRT1</i> en el teixit hepàtic per grups de creixement postnatal.....	68
Figura 18 Morfometria del teixit hepàtic en els grups de creixement recuperador postnatal.....	69

Figura 19 Correlacions entre l'expressió gènica de <i>STK11</i> i <i>SIRT1</i> en el teixit hepàtic amb els paràmetres corporals d'estudi en els diferents grups de creixement postnatal.....	70
Figura 20 Correlacions entre l'expressió gènica de <i>STK11</i> i <i>SIRT1</i> en el teixit hepàtic amb els paràmetres metabòlics d'estudi en els diferents grups de creixement postnatal.....	71
Figura 21 Expressió de <i>STK11</i> , <i>DLK1</i> i <i>SIRT1</i> en el teixit muscular per grups de creixement postnatal.....	72
Figura 22 Correlacions entre l'expressió gènica de <i>STK11</i> , <i>DLK1</i> i concentració de la proteïna <i>SIRT1</i> en el teixit muscular amb els paràmetres metabòlics d'estudi en els diferents grups de creixement postnatal.....	73
Figura 23 Expressió de <i>STK11</i> , <i>DLK1</i> i <i>SIRT1</i> en la placenta per grups de creixement postnatal.....	75
Figura 24 Concentració de la proteïna <i>STK11</i> i <i>SIRT1</i> en la placenta per grups de creixement postnatal.....	76
Figura 25 Correlacions entre l'expressió gènica de <i>STK11</i> , <i>DLK1</i> , <i>SIRT1</i> en el teixit placentari amb els paràmetres corporals d'estudi en els diferents grups de creixement postnatal.....	77
Figura 26 Model proposat per l'expressió dels gens <i>STK11</i> , <i>DLK1</i> i <i>SIRT1</i> en el teixit adipós retroperitoneal en els grups de creixement recuperador postnatal i la seva relació amb el metabolisme energètic i associacions amb els paràmetres corporals i metabòlics.....	87
Figura 27 Model proposat per l'expressió dels gens <i>STK11</i> i <i>SIRT1</i> en el teixit hepàtic en els grups de creixement recuperador postnatal i la seva relació amb el metabolisme energètic i associacions amb els paràmetres corporals i metabòlics.....	89
Figura 28 Model proposat per l'expressió dels gens <i>STK11</i> , <i>DLK1</i> i <i>SIRT1</i> en el teixit muscular en els grups de creixement recuperador postnatal i la seva relació amb el metabolisme energètic i associacions amb els paràmetres corporals i metabòlics.....	91

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1 Causes i/o factors coneguts de la restricció de creixement fetal.....	11
Taula 2 Paràmetres i rangs per a determinar la síndrome metabòlica.....	21
Taula 3 Paràmetres corporals i metabòlics de les rates gestants en funció de la ingesta calòrica durant la gestació.....	57
Taula 4 Paràmetres corporals de les cries al naixement per cesària en funció de la ingesta calòrica de les mares durant la gestació.....	57
Taula 5 Paràmetres corporals de les rates gestants en funció de la ingesta calòrica durant la gestació i durant la lactància.....	58
Taula 6 Paràmetres corporals i metabòlics de les cries en funció del creixement recuperador postnatal	59
Taula 7 Variables d'expressió gènica i morfomètriques en el teixit adipós retroperitoneal....	62
Taula 8 Correlacions de les variables en relació a l'expressió gènica dels gens d'estudi en el teixit adipós retroperitoneal.....	65
Taula 9 Variables d'expressió gènica i morfomètriques en el teixit hepàtic.....	68
Taula 10 Correlacions de les variables en relació a l'expressió gènica dels gens d'estudi en el teixit hepàtic.....	70
Taula 11 Variables d'expressió gènica en el teixit muscular.....	72
Taula 12 Correlacions de les variables en relació a l'expressió gènica dels gens d'estudi en el teixit muscular.....	73
Taula 13 Resum dels resultats d'expressió gènica dels gens d'estudi i de les correlacions significatives presentades en els teixits adipós retroperitoneal, hepàtic i muscular.....	74
Taula 14 Variables d'expressió gènica en la placenta.....	76
Taula 15 Correlacions de les variables en relació a l'expressió gènica dels gens d'estudi en el teixit placentari.....	77

ÍNDEX

LLISTAT D'ABREVIATURES	i
ÍNDEX DE FIGURES.....	iii
ÍNDEX DE TAULES	v
Resum.....	1
Resumen.....	2
Summary	3
INTRODUCCIÓ	5
1.1. La programació metabòlica.....	6
1.1.1. La desnutrició prenatal.....	7
1.1.2. La nutrició postnatal.....	8
1.2. El creixement prenatal.	9
1.2.1. La restricció prenatal.	10
1.2.2. La placenta.....	12
1.3. El creixement postnatal.....	15
1.3.1. El creixement recuperador postnatal.	15
1.4. Els desordres metabòlics.....	17
1.4.1. La resistència a la insulina.....	18
1.4.2. L'obesitat.	19
1.4.3. La síndrome metabòlica.	20
1.4.4. La diabetis tipus 2.....	22
1.5. Els teixits de regulació metabòlica.....	22
1.5.1. El teixit adipós.	22
1.5.2. El teixit hepàtic.	24
1.5.3. El teixit muscular.	25
1.6. Gens implicats en el metabolisme energètic.....	26
1.6.1. El gen <i>STK11</i>.....	26
1.6.1.1. Efectes del gen <i>STK11</i> en el teixit adipós.....	28
1.6.1.2. Efectes del gen <i>STK11</i> en el teixit hepàtic.	28
1.6.1.3. Efectes del gen <i>STK11</i> en el teixit muscular.	28
1.6.1.4. Agents terapèutics i el gen <i>STK11</i>.	28

1.6.2.	El gen <i>DLK1</i>	29
1.6.2.1.	Efectes del gen <i>DLK1</i> en el teixit adipós.	30
1.6.2.2.	Efectes del gen <i>DLK1</i> en el teixit hepàtic.	31
1.6.2.3.	Efectes del gen <i>DLK1</i> en el teixit muscular.	31
1.6.2.4.	Agents terapèutics i el gen <i>DLK1</i>	31
1.6.3.	El gen <i>SIRT1</i>	32
1.6.3.1.	Els efectes de <i>SIRT1</i> en el teixit adipós.	33
1.6.3.2.	Els efectes de <i>SIRT1</i> en el teixit hepàtic.....	34
1.6.3.3.	Els efectes de <i>SIRT1</i> en el teixit muscular.....	34
1.6.3.4.	Agents terapèutics i el gen <i>SIRT1</i>	34
	HIPÒTESIS	35
	OBJECTIUS	37
	MATERIAL I MÈTODES	39
4.1.	Model d'experimentació animal.....	40
4.1.1.	Model de restricció fetal.	41
4.1.1.1.	Animals i dieta prenatal.	41
4.1.1.2.	Recol·lecció de la sang i els teixits perinatals.	41
4.1.2.	Model de creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal....	42
4.1.2.1.	Animals i dieta postnatal.....	42
4.1.2.2.	Recol·lecció de la sang i els teixits postnats.	43
4.2	Determinació de marcadors metabòlics.....	43
4.2.1	La glucosa i els lípids.....	44
4.2.2	La insulina.	44
4.2.3	L'adiponectina.	45
4.3	Expressió gènica: ARN.	46
4.3.1	Extracció d'ARN.	46
4.3.1.1	Extracció d'ARN en la placenta, el fetge i el múscul.....	46
4.3.1.2	Extracció d'ARN en el teixit adipós.	47
4.3.1.3	Quantificació d'ARN total.....	47
4.3.2	Retrotranscripció d'ARN a ADNc.....	48

4.3.3	Reacció en cadena de la polimerasa.....	48
4.4.	Expressió gènica: proteïnes.....	49
4.4.1.	Extracció proteica.....	49
4.4.2.	Quantificació de proteïna total.....	50
4.4.3.	Quantificació de proteïnes específiques.....	50
4.4.3.1.	Quantificació de la proteïna <i>STK11</i>	51
4.4.3.2.	Quantificació de la proteïna <i>SIRT1</i>	51
4.5.	Morfometria dels teixits adipós i hepàtic.....	52
4.5.1.	Talls histològics.....	52
4.5.2.	Tinció amb hematoxilina-eosina.....	52
4.5.3.	Obtenció d'imatges i comptatge.....	53
4.6.	Anàlisi estadística.....	53
RESULTATS.....		55
5.1.	Model de restricció fetal.....	56
5.2.	Model de creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal.....	58
5.3.	Efecte del creixement recuperador postnatal en el metabolisme energètic mitjançant l'estudi de l'expressió dels gens <i>STK11</i> , <i>DLK1</i> i <i>SIRT1</i> en el teixit adipós retroperitoneal de les cries.....	61
5.3.1.	Comparació entre grups.....	62
5.3.2.	Associació entre variables.....	64
5.4.	Efecte del creixement recuperador postnatal en el metabolisme energètic mitjançant l'estudi de l'expressió dels gens <i>STK11</i> , <i>DLK1</i> i <i>SIRT1</i> en el teixit hepàtic de les cries.....	67
5.4.1.	Comparació entre grups.....	68
5.4.2.	Associació entre variables.....	69
5.5.	Efecte del creixement recuperador postnatal en el metabolisme energètic mitjançant l'estudi de l'expressió dels gens <i>STK11</i> , <i>DLK1</i> i <i>SIRT1</i> en el teixit muscular de les cries.....	71
5.5.1.	Comparació entre grups.....	72
5.5.2.	Associació entre variables.....	72
5.6.	Resum de les associacions en els teixits de regulació metabòlica.....	74
5.7.	Efecte de la restricció prenatal en el metabolisme energètic mitjançant l'estudi de l'expressió dels gens <i>STK11</i> , <i>DLK1</i> i <i>SIRT1</i> en el teixit placentari.....	75
5.7.1.	Comparació entre grups.....	75
5.7.2.	Associació entre variables.....	76

DISCUSSIÓ	79
6.1. Model de restricció fetal.	80
6.1.1. Establiment del model.	80
6.1.2. Paràmetres metabòlics en rates gestants.	81
6.2. Model de creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal.	81
6.2.1. Establiment del model.	81
6.2.2. Paràmetres corporals de les cries.	82
6.2.3. Paràmetres metabòlics de les cries.	83
6.3. Estudi de l'expressió dels gens <i>STK11</i>, <i>DLK1</i> i <i>SIRT1</i> en el teixit adipós retroperitoneal.	84
6.4. Estudi de l'expressió dels gens <i>STK11</i>, <i>DLK1</i> i <i>SIRT1</i> en el teixit hepàtic.	87
6.5. Estudi de l'expressió dels gens <i>STK11</i>, <i>DLK1</i> i <i>SIRT1</i> en el teixit muscular.	90
6.6. Estudi de l'expressió dels gens <i>STK11</i>, <i>DLK1</i> i <i>SIRT1</i> en la placenta.	92
6.7. Discussió conjunta.	93
CONCLUSIONS	97
BIBLIOGRAFIA	101

Resum

Tant l'ambient prenatal com l'ambient postnatal tenen un gran impacte en el risc de patir malalties metabòliques en l'edat adulta. Estudis clínics han mostrat com condicions adverses en aquests períodes de la vida poden programar els processos fisiològics i augmentar el risc de desenvolupar malalties en l'edat adulta, com ara l'obesitat, la diabetis tipus 2, la síndrome metabòlica i les malalties cardiovasculars. És la coneguda programació fetal de les malalties metabòliques de l'adult. Estudis en diversos models animals també han demostrat alteracions del metabolisme després d'una restricció fetal. Tot i això, molts dels mecanismes relacionats amb aquestes alteracions de la programació fetal encara són desconeguts.

L'objectiu d'aquesta tesi ha estat estudiar, a través d'un model de creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal, els canvis moleculars en l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* (tots ells gens relacionats amb el metabolisme energètic) en els teixits adipós, hepàtic, muscular i placentari.

Per estudiar les alteracions precoces secundàries a la programació metabòlica descrita s'ha dissenyat un model animal de creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal en rates *Wistar*. S'han analitzat paràmetres corporals (pes i massa grassa visceral), metabòlics (adiponectina, glucosa, insulina, HOMA-IR i lípids), morfomètrics (anàlisi d'imatges dels teixits adipós i hepàtic) i genètics (expressió de *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal, el fetge, el múscul esquelètic i la placenta) en les cries en el dia postnatal 42.

En les cries amb creixement recuperador postnatal s'observa una acumulació excessiva de teixit adipós visceral, una disminució dels nivells d'adiponectina i un augment dels triglicèrids circulants i del valor de HOMA-IR en el dia postnatal 42. Aquestes cries també mostren una baixa expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en els teixits adipós retroperitoneal, hepàtic i muscular que es relacionen amb una acumulació de greix visceral, una hipertròfia del teixit adipós, una acumulació lipídica en el fetge i un estat de resistència a la insulina. No s'observen canvis d'expressió d'aquests gens en la placenta.

En conclusió, el creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal provoca canvis en l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en els teixits de regulació metabòlica, els quals podrien ser noves dianes terapèutiques per a la prevenció precoç de la programació fetal dels desordres metabòlics en l'edat adulta.

Resumen

No solamente el ambiente prenatal sino también el ambiente postnatal tiene un gran impacto en el riesgo de padecer enfermedades metabólicas en la edad adulta. Estudios clínicos han mostrado como condiciones adversas en estos periodos de la vida pueden programar los procesos fisiológicos y aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades en la edad adulta como la obesidad, la diabetes tipo 2, el síndrome metabólico y las enfermedades cardiovasculares. Es la conocida programación fetal de las enfermedades metabólicas del adulto. Estudios en varios modelos animales también han demostrado alteraciones del metabolismo después de una restricción fetal. Sin embargo, muchos de los mecanismos relacionados con estas alteraciones de la programación fetal aun son desconocidos.

El objetivo de esta tesis ha sido estudiar, a través de un modelo animal de crecimiento recuperador postnatal secundario a restricción de peso prenatal, los cambios moleculares en la expresión de los genes *STK11*, *DLK1* y *SIRT1* (todos ellos genes relacionados con el metabolismo energético) en los tejidos adiposo, hepático, muscular y placentario.

Para estudiar las alteraciones precoces secundarias a la programación metabólica descrita se diseñó un modelo de crecimiento recuperador postnatal secundario a restricción de peso prenatal en ratas *Wistar*. Se analizaron parámetros corporales (peso y masa grasa visceral), metabólicos (adiponectina, glucosa, insulina, HOMA-IR y lípidos), morfométricos (análisis de imágenes de tejido adiposo y hepático) y genéticos (expresión de *STK11*, *DLK1* y *SIRT1* en el tejido adiposo retroperitoneal, el hígado, el músculo esquelético y la placenta) en las crías en el día postnatal 42.

En las crías con crecimiento recuperador postnatal observamos una acumulación excesiva de tejido adiposo visceral, una disminución de los niveles de adiponectina y un aumento de los triglicéridos circulantes y del valor de HOMA-IR en el día postnatal 42. Estas crías también muestran una baja expresión de los genes *STK11*, *DLK1* y *SIRT1* en los tejidos adiposo retroperitoneal, hepático y muscular que se relacionan con una acumulación de grasa visceral, una hipertrofia del tejido adiposo, una acumulación lipídica en el hígado y un estado de resistencia a la insulina. No se observaron cambios de expresión de estos genes en la placenta.

En conclusión, el crecimiento recuperador postnatal secundario a restricción de peso prenatal provoca cambios en la expresión de los genes *STK11*, *DLK1* y *SIRT1* en los tejidos de regulación metabólica, los cuales podrían ser nuevas dianas terapéuticas para la prevención precoz de la programación fetal de los desórdenes metabólicos en la edad adulta.

Summary

Both the prenatal and postnatal environment have a profound impact on the risk for major chronic diseases in adulthood. Clinical studies have demonstrated that adverse conditions in these periods of life can program the physiological processes leading to future adult diseases, such as obesity, type 2 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular disease. This process is known as the fetal programming of adult metabolic diseases. Metabolic alterations following fetal restriction have also been demonstrated in various animal models. However, most of the mechanisms underlying the alterations in fetal programming remain largely unknown.

The aim of this thesis has been to study, by means of an experimental animal model of catch-up growth following fetal weight restriction, changes in the gene expression of energetic metabolism-related genes *STK11*, *DLK1* and *SIRT1* in adipose, hepatic, muscular and placental tissues.

In order to study early alterations secondary to metabolic programming, a model of catch-up growth following fetal growth restriction was set in *Wistar* rats. Body (body weight and visceral fat mass), physiological (adiponectin, glucose, insulin, HOMA-IR and lipids) and morphometric parameters (adipose and hepatic tissue image analysis) and gene expression studies (*STK11*, *DLK1* and *SIRT1* expression in adipose tissue, liver, skeletal muscle and placenta) were assessed in pups at postnatal day 42.

Excessive adipose tissue accumulation, decreased circulating adiponectin and increased triglycerides levels, and higher HOMA-IR values were observed in pups with catch-up growth at postnatal day 42. These pups also showed reduced expression of *STK11*, *DLK1* and *SIRT1* genes in retroperitoneal adipose, hepatic and muscular tissues and these changes in gene expression were related to visceral fat accumulation and adipose tissue hypertrophy, lipid accumulation in the liver and insulin resistance. No changes in gene expression were observed in placental tissue.

In conclusion, catch-up growth following prenatal growth restriction leads to changes in *STK11*, *DLK1* and *SIRT1* gene expression in tissues involved in metabolic regulation. These genes could be new therapeutic targets for early prevention on fetal programming of metabolic disorders in adulthood.

INTRODUCCIÓ

1.1. La programació metabòlica.

Les alteracions provocades per un ambient subòptim durant el desenvolupament intrauterí, i també durant els primers estadis de la vida postnatal, poden tenir efectes permanents en els sistemes que modulen la regulació del balanç energètic corporal. Els estudis epidemiològics i experimentals de les últimes dècades indiquen que un ambient tant de sobrenutrició com de desnutrició durant el desenvolupament prenatal està relacionat amb la programació metabòlica de la descendència.

S'ha descrit, tant a partir d'estudis en poblacions humanes com també en models animals, que aquestes alteracions programen de manera permanent canvis en l'estructura i la funció dels teixits, cosa que reprograma el sistema endocrí i les vies de regulació energètica i altera el fenotip fisiològic adult (Figura 1). Els efectes d'aquesta programació metabòlica s'associen amb una major incidència d'alteracions en l'edat adulta com ara intolerància a la glucosa, obesitat, hipertensió, diabetis tipus 2 i malalties cardiovasculars [1][2].

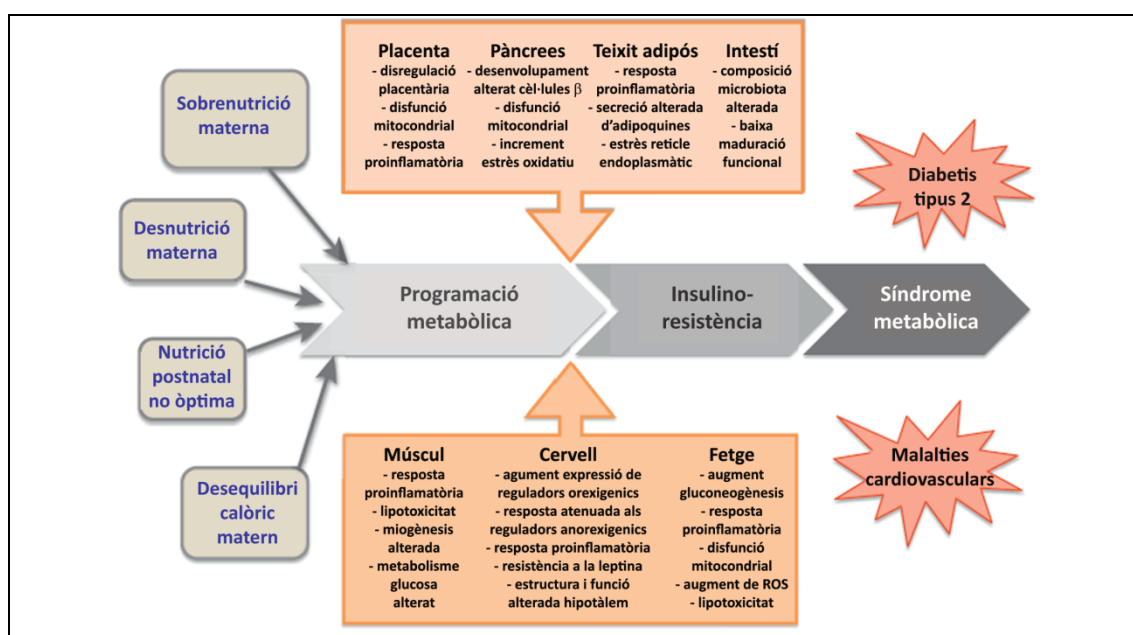


Figura 1. Causes i conseqüències de la insulinoresistència en la programació fetal. Diferents tipus de nutrició materna causen insulinoresistència en la descendència a través de diversos mecanismes en diferents òrgans i teixits. En conseqüència, aquesta insulinoresistència provoca en la descendència el desenvolupament de la síndrome metabòlica i malalties associades com la diabetis tipus 2 i les malalties cardiovasculars. Adaptació de Duque-Guimaraes [3].

Molts autors suggereixen que les alteracions metabòliques i la susceptibilitat en el desenvolupament de malalties relacionades amb aquestes alteracions en l'edat adulta

reflecteix i ressalta la complexitat de les interaccions entre el potencial genètic i els factors ambientals en cada individu.

En aquest estudi ens centrarem en els efectes de la restricció prenatal i la posterior nutrició postnatal en la programació metabòlica de la descendència.

1.1.1. La desnutrició prenatal.

Fa més de 50 anys, la fam hivernal d'Holanda de finals de la segona guerra mundial va permetre als investigadors estudiar els efectes immediats, a llarg termini i transgeneracionals de la desnutrició materna en humans [4][5]. Entre els anys 1944 i 1945 moltes dones gestants van patir una desnutrició severa. L'efecte en el pes al naixement i la salut dels seus nadons va incloure un augment de l'adipositat postnatal i malalties autoimmunes però no hi va haver un increment de la incidència de malalties metabòliques o cardiovasculars en la infància [5]. Malgrat això, aquests mateixos individus van presentar un major risc de desenvolupar malalties cardiovasculars i diabetis en l'edat adulta [5]. A partir d'aquestes observacions, molts autors apunten que les condicions ambientals en els primers estadis de la vida poden causar canvis epigenètics que es poden mantenir al llarg de la vida [4]. A més a més, la major incidència del risc metabòlic es va observar sobretot en aquells individus nascuts de les mares afectades per la fam en l'últim trimestre de gestació [6].

Per primera vegada es va proposar que les variacions de l'ambient intrauterí podien influenciar l'expressió del genoma fetal i provocar en el fetus unes adaptacions o canvis de desenvolupament que programarien l'individu a llarg termini [7]. D'aquesta manera es va formar la hipòtesi o la teoria de la programació fetal. El nom de *programació* es va escollir perquè el fetus queda programat per presentar efectes a llarg termini, molt després que el factor ambiental que ho ha provocat hagi estat ja eliminat. Aquest terme defineix el fenomen pel qual un estímul o insult en un període crític i sensible de la vida té un efecte permanent en l'estructura, la fisiologia i el metabolisme de l'individu.

A partir de llavors, es van estudiar altres paràmetres en relació al risc de desenvolupar malalties en l'edat adulta. Es va estudiar el pes al naixement i també la relació entre el pes de la placenta i el pes del nadó com a marcador de la restricció fetal independentment del fet de presentar un pes al naixement òptim o no [8] i com a indicador de la funció de la placenta a nivell prenatal [9]. Altres estudis també van incloure associacions amb el període postnatal i la presència o no de creixement recuperador postnatal [8]. A mitjans dels anys 70 es van realitzar els primers estudis que mostraven com la desnutrició fetal seguida d'un creixement

recuperador postnatal s'associava amb l'obesitat en l'edat adulta, i en canvi, si la desnutrició fetal estava seguida per una restricció calòrica durant els primer període de vida postnatal, hi havia menys presència d'obesitat en adolescents i adults joves [6]. Aquestes observacions van donar peu a suggerir que no només el creixement fetal sinó també el creixement recuperador postnatal podrien donar pas a l'obesitat i al seu conseqüent risc metabòlic i cardiovascular [10].

1.1.2. La nutrició postnatal.

La hipòtesi o teoria del fenotip estalviador (*thrifty phenotype*) proposa que el desenvolupament fetal és sensible als canvis en l'ambient nutricional i per tant el fetus és capaç d'adaptar-se a un ambient advers. En un ambient fetal pobre, hi ha una resposta adaptativa que procura optimitzar el creixement de certs òrgans, com el cervell, en detriment d'altres, com per exemple els viscerals, per augmentar les probabilitats de supervivència del fetus. Les condicions de l'ambient fetal programen un fenotip particular, adaptat davant les condicions que s'hi presenten. En el cas d'una desnutrició durant el període de creixement fetal, l'individu adaptarà el seu fenotip de manera que presentarà un fenotip adequat per a un ambient postnatal amb característiques semblants a les condicions intrauterines de desnutrició. Però si l'ambient extrauterí difereix en gran mesura de l'intrauterí, és a dir, la nutrició postnatal presenta abundància de nutrients respecte a la prenatal, el fetus pateix un creixement recuperador postnatal i té més risc de patir malalties metabòliques a llarg termini [11][12][13][14].

Llavors, és el desajust entre els ambients fetal i postnatal, és a dir, la combinació de la restricció intrauterina seguida del creixement recuperador postnatal, el qual altera permanentment l'estructura corporal i fisiològica i en conseqüència contribueix a l'aparició de l'obesitat i el risc cardiovascular en l'edat adulta [8][15][16][17]. En altres paraules, el problema sorgeix quan l'individu es troba en un ambient postnatal per al qual no estava predefinit. D'aquesta manera el creixement recuperador postnatal, que era vist com un pas essencial per a la recuperació dels efectes deleteris d'un creixement intrauterí pobre i per restablir fisiològicament la trajectòria del creixement genèticament programada, s'ha considerat com un dels majors factors de risc per a l'obesitat i les malalties metabòliques cròniques [18]. Tot i que sembla clar que la causa sigui el desequilibri entre la nutrició prenatal i postnatal, els mecanismes pels quals es generen les alteracions metabòliques encara no són del tot coneguts.

1.2. El creixement prenatal.

El creixement fetal es dona de manera continuada durant tota la gestació, tot i que segueix un patró exponencial amb un punt de màxim creixement en el tercer trimestre [19] [20] que coincideix amb un increment de la massa grassa fetal [20][21]. Tant el creixement com el metabolisme fetal depenen directament dels nutrients que creuen la placenta i, per tant, la mare adapta el seu metabolisme per donar suport al pas continu de substrats cap al fetus.

El fetus es desenvolupa en un ambient on les funcions de respiració, alimentació i excreció són proporcionades per la placenta. La glucosa és el substrat primari per al metabolisme de la placenta i el fetus. El fetus humà sintetitza els seus propis carbohidrats, greixos i proteïnes a partir de la glucosa, els aminoàcids i altres metabòlits de cadena curta transferits des de la mare cap al fetus [14]. El total de nutrients transferits depenen del tipus de transport placentari per a cada nutrient, dels seus nivells en la sang materna, del total de flux sanguini en la placenta i de l'àrea superficial dels *villi* perifèrics de la placenta [10].

El metabolisme fetal està orientat cap a l'anabolisme, i el creixement d'òrgans i teixits està regulat per factors de creixement que funcionen de manera autocrina o paracrina durant la major part de la gestació. En aquest ambient fetal l'homeòstasi de la glucosa i la insulina és essencial per a un emmagatzematge energètic eficient i un metabolisme fetal òptim [10].

El període exponencial de creixement fetal del tercer trimestre provoca una mobilització massiva de les reserves energètiques en la mare, així com també desencadena canvis en l'acció i producció de la insulina materna, bàsicament per suplir la demanda creixent de nutrients del fetus. Sobretot provoca l'augment de lípids circulants ja que, encara que els triglicèrids materns no creuen directament la placenta, són una font essencial d'àcids grassos pel fetus. A nivell placentari, aquests triglicèrids són hidrolitzats en àcids grassos per permetre la seva difusió al plasma fetal. Per tant, l'aportació adequada de nutrients per al fetus es dona tant per la part materna com placentària, i la comunicació metabòlica entre la mare, la placenta i el fetus és clau i s'ha de donar correctament a nivell dels patrons de transcripció i expressió gènica [10][22].

Per tot això, el creixement i el desenvolupament fetal depèn del potencial genètic del fetus modulats pels factors ambientals, biològics i hormonals que l'envolten, incloent-hi la salut i nutrició de la mare. El fetus depèn completament de l'estat nutricional de la mare i de la

capacitat de transport de nutrients de la placenta per a nodrir-se. L'ambient matern tendeix a restringir el creixement fetal, sobretot en el primer trimestre, possiblement com a reflex de la importància per a la mare de restringir els requeriments nutricionals del fetus per assegurar la seva pròpia supervivència i la del fetus en un possible període d'escassetat.

El creixement fetal adequat és el resultat del funcionament equilibrat d'aquests diferents factors. Es considera que un nounat té un pes normal quan presenta un creixement adequat per a la seva edat gestacional (AEG), és a dir, un pes al naixement entre 2 i menys 2 desviacions estàndard en relació amb dades de referència poblacional determinats per edat gestacional, gènere i ètnia [23][24].

1.2.1. La restricció prenatal.

La restricció de creixement fetal està associada amb la morbiditat i la mortalitat perinatal i amb el desenvolupament de malalties en l'edat adulta [1][25]. Els nens nascuts amb restricció fetal poden presentar una disminució en la tolerància a la glucosa i una alteració en la secreció d'insulina a nivell corporal, resistència a la insulina i obesitat [26]. Es coneix que una secreció d'insulina inadequada i una disminució de la sensibilitat a la insulina al naixement contribueixen a un increment del risc de desenvolupar diabetis [27].

La restricció fetal es presenta en aproximadament el 4-8% dels nounats dels països desenvolupats i fins al 30% dels països en desenvolupament [24]. Aquesta restricció de pes fetal es pot definir utilitzant dos termes amb matisos diferents: els nadons amb creixement intrauterí retardat (CIR) i els nadons petits per a l'edat gestacional (PEG). Encara que sovint s'utilitzen de manera intercanviable com a sinònims, els dos termes no són totalment equivalents [10][27].

Els nadons CIR es caracteritzen per una disminució de la velocitat de creixement *in utero*, i presenten un pes fetal per sota del percentil 10 per a l'edat gestacional a més de signes de restricció fetal com ara disminució del líquid amniòtic o alteracions en les proves de benestar fetal. Malgrat això, al néixer poden presentar un pes normal o un baix pes. En les gestacions CIR hi ha una estreta relació entre un baix pes placentari i un baix pes fetal, sobretot en els casos més severos de restricció intrauterina associats a una velocitat anormal de Doppler de l'arteria umbilical, eina àmpliament utilitzada per avaluar el benestar fetal [20].

Per altra banda, els nadons PEG es defineixen com infants nascuts amb un pes al naixement per sota de 2 desviacions estàndard en relació amb dades de referència poblacional

determinats per edat gestacional, gènere i ètnia [24]. Per tant, el terme PEG es refereix a la mida del nadó, generalment el pes i la llargada al naixement, sense tenir en compte la trajectòria intrauterina precedent. La majoria de nadons PEG han estat també CIR durant el creixement fetal, però no tots ja que alguns presenten una valoració anatòmica i unes proves de benestar fetal normal.

També cal diferenciar la definició general de baix pes al naixement (BPN) que és un terme genèric que, en humans, es defineix com la presentació d'un pes inferior a 2500 grams al néixer, sense ser estandarditzat per a l'edat gestacional corresponent.

Taula 1. Causes i/o factors coneguts de la restricció de creixement fetal.

Causes maternes	Causes fetals	Causes placentàries
Aportació nutricional insuficient	Anormalitats cromosòmiques	Insuficiència placentària
Malalties vasculars, hipertensió arterial i preeclàmpsia	Malformacions estructurals	Disfunció placentària
Malalties cardíques	Infeccions fetals	Infarts placentaris
Malalties respiratòries	Displàsies esquelètiques	Vasculitis
Malalties renals	Gestació múltiple	Placenta prèvia
Trombofílies		Corioamnionitis crònica
Diabetis pregestacional		Inserció anormal del cordó umbilical
Exposició a tòxics (fàrmacs o drogues), abús d'alcohol i abús de tabac		Placenta circumval·lada
Infeccions intrauterines		Corioangioma
Antecedents de fetus PEG altres gestacions		Artèria umbilical única
Antecedents de talla baixa dels progenitors		

La restricció de creixement fetal pot ser deguda a la presència d'un o més factors patològics (Taula 1). Tot i les causes conegudes, en la majoria de casos de restricció de creixement fetal la causa és desconeguda o idiopàtica [28] i actualment representen un ampli camp d'estudi.

La restricció fetal està caracteritzada per una hipòxia i una hipoglucèmia del fetus, amb altes concentracions circulants de lactat i triglicèrids, a més de canvis endocrins que inclouen disminució d'insulina, tiroxina i factors de creixement com les proteïnes IGF [9]. La insulina és el regulador principal de la IGF1 prenatalment, i totes dues hormones, a més de la IGF2, són factors clau en el control del creixement fetal. Es coneix l'associació positiva entre els nivells d'insulina i IGF1 i el pes i l'alçada al naixement [10]. La insulina és un dels factors claus en promoure el creixement fetal i està en acord amb el concepte del *gen estalviador* per optimitzar un emmagatzematge d'energia eficient.

Durant la gestació, el fetus en desenvolupament depèn de la mare per a tots els requeriments nutricionals. No és estrany, doncs, que les variacions en la nutrició materna, i sobretot els canvis en la transferència de nutrients entre la mare, la placenta i el fetus, puguin reflectir-se

en alteracions en la salut i el benestar fetal [7][8]. Hi ha evidències que demostren que la placenta pot jugar un paper important en les alteracions en la composició corporal i en el metabolisme fetals.

La disfunció placentària és la major causa de restricció fetal i de programació de la salut a llarg termini en humans. Els models animals de restricció de creixement placentari han estat desenvolupats per a testar directament el paper de la funció de la placenta en la programació de les malalties en l'edat adulta [27]. El creixement placentari restringit en models animals indueix canvis similars en la secreció i sensibilitat a la insulina, tal com veiem en els nadons CIR i/o PEG, entre d'altres, i els fa valuosos com a eina per a investigar les conseqüències del retard de creixement fetal [27]. Estudis sobre la fisiologia de la placenta i futures intervencions per millorar la funció placentària són de gran importància ja que optimitzar la funció placentària pot portar beneficis en la salut a llarg termini [7].

1.2.2. La placenta.

La placenta és un òrgan transitori i diferenciat ubicat en la cavitat uterina que serveix perquè l'embrió es nodreixi i es desenvolupi correctament, i constitueix una unitat funcional entre la mare i el fetus durant la gestació. Des de la primera setmana de gestació la placenta actua també com a un nou òrgan endocrí secretant hormones que influeixen en el metabolisme dels nutrients per mantenir l'homeòstasi i assegurar el desenvolupament i el creixement del fetus. La maduració de la placenta es produeix progressivament durant tota la gestació afavorint així que el transport de nutrients s'adapti per cobrir les necessitats del creixement fetal [20].

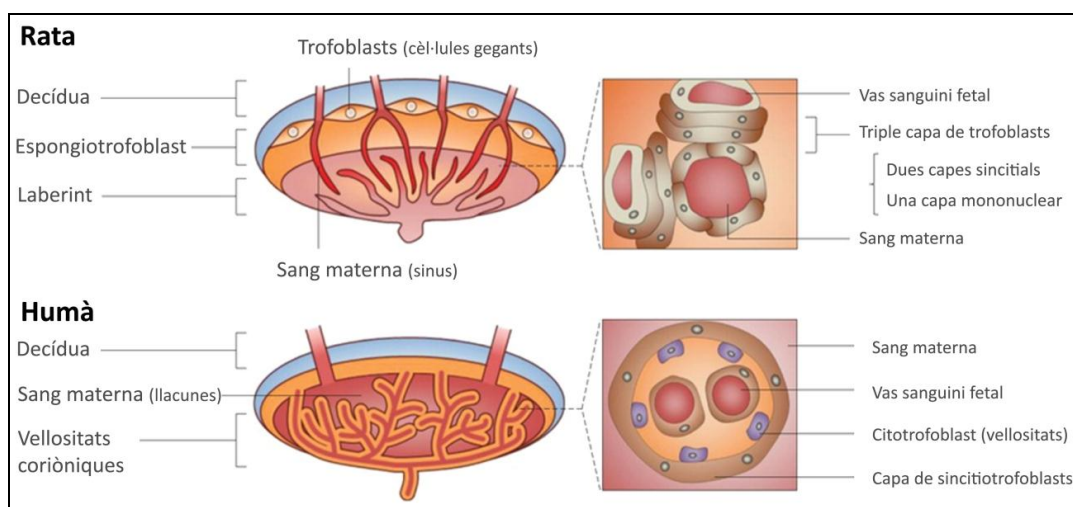


Figura 2. Comparació entre l'estructura de la placenta de rata i la placenta humana. Adaptació de Sun [29].

La placenta és una estructura específica de la gestació dels animals mamífers euteris que es desenvolupa juntament amb l'embrió i que està composta de diferents tipus cel·lulars. Tot i que l'estructura de la placenta difereix considerablement entre les espècies animals, la morfologia bàsica, és a dir, les cèl·lules principals i la seva funció, així com també els mecanismes moleculars involucrats en el seu desenvolupament, són conservats entre espècies [30]. Els primats i rosegadors presenten una placenta de tipus hemocorial (Figura 2). La placenta hemocorial és una forma invasiva de placentació o formació de la placenta, és a dir, els teixits materns són envaïts per les vellositats corials vascularitzades des de la cara fetal. La formació de la placenta comença amb la implantació del blastocist a l'endometri, moment en el qual les primeres cèl·lules que es diferencien de l'embrió, anomenades cèl·lules trofoblàstiques o trofoblasts, inicien el procés de placentació.

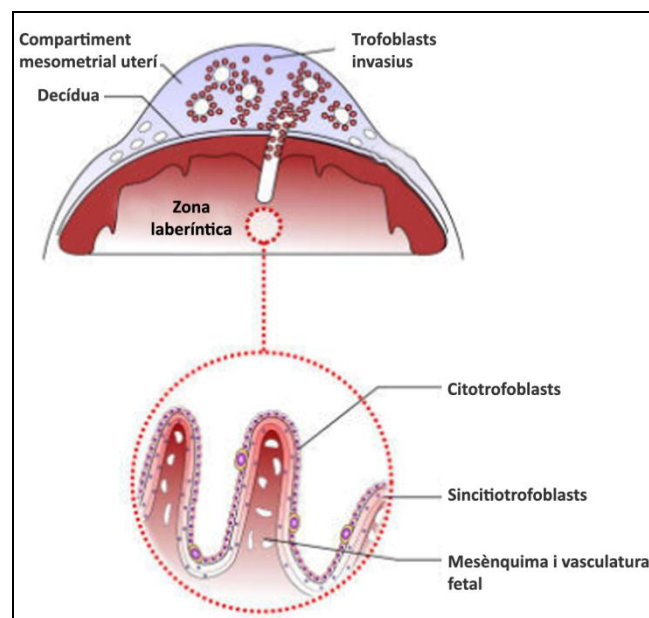


Figura 3. Esquema de la placenta de rata. Adaptació de Soares [31].

En primer lloc, a la cara materna, els trofoblasts inicien un procés d'invasió de la decídua. La decídua materna pateix una erosió i desintegració gradual de la seva innervació i de la capa muscular dels vasos sanguinis fins que aquests es converteixen en llacunes. En aquestes llacunes arribarà el torrent sanguini de la mare a través de les venes uterines transformades en grans sinusoides que drenaran el llit placentari per realitzar l'intercanvi d'oxigen i nutrients. En el cas de la rata, la invasió profunda dels trofoblast és molt similar a la dels humans [30]. En aquest procés de placentació és molt important que la invasió de les arterioles espiralades a la decídua es faci correctament. La conseqüència final de la formació d'aquestes llacunes o

sinusoides és la vasodilatació de la circulació uteroplacentària per formar un sistema de baixa pressió i alt flux [32].

A la cara fetal de la placenta trobem les vellositats corials. Aquestes vellositats augmenten amb l'edat gestacional i amb el pes fetal. Al final de la gestació s'observa un augment del volum i una disminució de l'engruiximent de la membrana d'aquestes vellositats. L'augment de la mida de la placenta al llarg de la gestació es dona precisament per augmentar la superfície i el volum sanguini en l'espai intervellós ja que la seva funció principal és la de filtració o intercanvi. En el cas de la rata, les vellositats se situen a l'anomenada zona laberíntica que es posiciona a la cara fetal i està composta per trofoblasts gegants, sincitiotrofoblasts, cèl·lules mesenquimals fetals i vasculatura [30] (Figura 3).

La circulació a nivell placentari es realitza pràcticament entre dos bombes representades pel cor matern i el cor fetal, que assegurin el flux sanguini cap a la placenta. La placenta humana secreta estrògens que s'incorporen al torrent circulatori matern i tenen un paper important en el manteniment del flux sanguini uteroplacentari [33]. A més a més, existeixen mecanismes vasomotors localitzats en la decídua que regulen el volum de sang materna a l'espai intervellós. L'àrea total per a l'intercanvi es veu reduïda en placentes complicades amb restricció de creixement fetal.

La funció placentària es pot estimar a partir de la mida o el pes de la placenta els quals són uns bons indicadors de la funció de la placenta a nivell prenatal. A més a més també existeix una correlació entre el pes placentari i el pes del nadó al naixement, i la relació derivada d'aquests dos paràmetres es troba associada a l'estrès fetal així com també a la presència de malalties en l'edat adulta, particularment en presència de baix pes al naixement. Els factors que influeixen en el pes de la placenta són l'edat gestacional, el pes de la mare, el sexe del fetus, presentar una gestació única o múltiple, presentar una preeclàmpsia, hàbits de tabac de la mare, concentració d'oxigen disponible o alteracions de la nutrició materna.

De manera normal, la placenta i el fetus estan exposats a una gran varietat de factors ambientals. La ingesta d'aliments i el contingut de macro i micronutrients de la dieta poden variar durant la gestació en resposta a fluctuacions estacionàries, escassetat o abundància de certs aliments en animals i a causa de canvis dietètics o estils de vida en els humans. La disponibilitat d'oxigen pot variar segons l'altitud del lloc de residència, per anèmia materna, per inhalació de monòxid de carboni en fumadores o a causa de la contaminació ambiental. L'oxigenació fetal també varia en funció de canvis en el flux sanguini umbilical. Les condicions ambientals durant el desenvolupament intrauterí també es poden veure alterades per

drogues, com l'alcohol i la nicotina, i per l'estrès psicosocial de la mare que pot influenciar la ingesta, el metabolisme i la secreció d'hormones [34]. Quan les condicions ambientals durant la gestació són pobres, i particularment quan la qualitat dels aliments ingerits és baixa o limitada, la placenta presenta restricció de creixement [2]. Aquesta restricció de creixement placentari afecta directament al fetus, provocant restricció de creixement fetal.

1.3. El creixement postnatal.

El creixement postnatal, es dona a partir del naixement dels individus i durant els dos primers anys de vida. Per mesurar aquest creixement postnatal s'utilitzen els paràmetres de pes i d'alçada, però també el perímetre cranial, el gruix dels plecs subcutanis i la maduració òssia. El guany de pes després del naixement, i també durant tota la vida, depèn de la nutrició postnatal.

1.3.1. El creixement recuperador postnatal.

El creixement recuperador postnatal es defineix com un creixement en alçada i/o pes a una velocitat per sobre dels límits de normalitat per a l'edat i/o maduresa durant un període definit de temps i que es presenta després d'un període transitori d'inhibició de creixement [28][35].

El creixement recuperador postnatal es dona en els infants amb baix pes al naixement. El creixement recuperador postnatal generalment succeeix entre el naixement i els primers dos anys de vida, durant els quals si aquests nadons recuperen 0.67 desviacions estàndard, considerem clínicament que han patit un creixement recuperador [16]. Aquest creixement és màxim durant els primers sis mesos de vida on el creixement recuperador es dona ràpidament en pes, mentre que el creixement recuperador en alçada és més gradual i continuat durant tot el període infantil [10][24]. Quasi el 90% dels infants amb baix pes al naixement presenten un creixement recuperador postnatal durant els primers dos anys de vida que restaura parcialment aquest retard i arriben a assolir el pes i/o alçada estàndards [24].

Wilson i col·laboradors [28] van identificar 6 factors importants per a l'extensió del creixement recuperador: la naturalesa de la desnutrició, la severitat de la desnutrició, la durada del període de desnutrició, l'estadi de desenvolupament del cos en el moment de l'inici de la desnutrició, el ritme de maduració de l'espècie (espècies amb un ritme de maduració lent es recuperen millor de la desnutrició), i el patró de la realimentació.

El creixement recuperador postnatal després d'una restricció fetal s'ha mostrat com un factor de risc en la programació de malalties metabòliques en l'edat adulta així com també s'ha mostrat com un factor independent per al risc de sobrepès i obesitat que es pot manifestar en la infantesa [16][36].

D'acord amb la definició acceptada per la Organització Mundial de la Salut (OMS), un creixement de pes i/o alçada per sota de 2 desviacions estàndard per edat i sexe indica desnutrició. L'objectiu de la rehabilitació nutricional és millorar el creixement de l'infant després de la malnutrició, cosa que resulta en un període de creixement accelerat, que compensa en part el període anterior de creixement a baix ritme [24][37]. Cal esmentar, però, que els patrons i/o taules de pes postnatal per edat es troben estandarditzats a partir dels nadons AEG. Per tant, el creixement postnatal òptim dels PEG no està totalment ben definit.

S'ha observat com un creixement recuperador postnatal excessiu del pes corporal provoca un augment del risc d'obesitat en l'edat adulta i com un creixement recuperador postnatal lent provoca una reducció d'aquest risc. Es coneix que els infants nascuts amb baix pes que es mantenen petits durant la infantesa presenten un menor risc d'obesitat i síndrome metabòlica en contraposició amb aquells infants nascuts amb baix pes que pateixen un creixement recuperador postnatal que excedeix el rang de pes dels AEG durant la infantesa i presenten un risc augmentat d'obesitat i síndrome metabòlica [16][36][38]. Tal com apunten molts dels estudis epidemiològics actuals, el creixement recuperador, que és potencialment beneficiós a curt termini, pot ser perjudicial a llarg termini per a la supervivència [12].

Actualment hi ha evidències que aquest creixement recuperador postnatal després d'una restricció de pes fetal es caracteritza per un guany desproporcionat de massa grassa en relació al guany de massa magra corporal i concorden amb estudis durant la infantesa o l'edat adulta que mostren com el greix es recupera més ràpid que la massa muscular [18]. Aquest procés de creixement recuperador en greix (*fat catch-up*) es produeix fins i tot en presència de dietes equilibrades, per tant fa pensar en una adaptació d'eficiència metabòlica com a reacció fisiològica a l'estat previ de desnutrició [18]. Diferents estudis en cohorts europees indiquen que els adults que van néixer amb baix pes presenten lleugerament més massa grassa i menys massa magra corporal, però marcadament molta més massa grassa visceral que els seus controls per edat i índex de massa corporal (IMC) similars [18]. Estudis recents mostren que nens prepuberals nascuts amb baix pes tenen més massa grassa i menys massa magra que els seus controls d'edat i pes similars; així com també nivells menors d'oxidació de la glucosa [10].

Aquest creixement recuperador postnatal es caracteritza per presentar nivells alts d'insulina circulant i un estat de resistència a la insulina lligat al fet de guanyar més massa grassa corporal [10]. A més a més, també s'associa a major grau d'adipositat abdominal en l'adolescència i prediu un risc augmentat d'obesitat, de diabetis i de malalties cardiovasculars en l'edat adulta [10][26]. Els infants que mostren un creixement recuperador postnatal més pronunciat es relacionen amb les restriccions intrauterines més severes [16]. Cal esmentar que aquest risc d'obesitat a llarg termini i complicacions associades amb la insulinoresistència no han estat només descrites en infants nascuts PEG, sinó també en infants AEG relativament prims al naixement, possiblement a causa d'una restricció intrauterina molt més subtil.

En humans, s'ha mostrat que l'alletament matern és preferible a l'alletament amb llet artificial, perquè la velocitat de creixement més lenta associada a l'alletament matern sembla ser protector de l'obesitat i les malalties cardiovasculars [39]. De la mateixa manera s'ha descrit que la desnutrició fetal seguida de restricció calòrica postnatal s'associa amb una disminució del risc d'obesitat en l'edat adulta [10].

En estudis en models animals, s'ha observat una sobreexpressió del receptor d'insulina en el fetge i el múscul durant el creixement recuperador postnatal [40]. També s'ha observat un augment de l'adipogènesi que resulta en una propensió a l'acumulació de greix durant els primers estadis de la vida [41]. Els animals que presenten creixement recuperador postnatal excessiu mostren també en l'edat adulta un fenotip d'obesitat caracteritzat per l'acumulació de greix visceral i la hipertròfia dels adipòcits [42].

Per tot això, l'anàlisi de la relació entre la restricció de creixement fetal i les alteracions metabòliques a llarg termini és important per evitar les conseqüències futures de les anomalies diagnosticades prenatalment. Per a la detecció precoç dels grup de risc és essencial identificar nous factors genètics i ambientals que predisposin els nadons amb baix pes a una recuperació ràpida i/o excessiva del pes durant els primers 12 mesos de vida.

1.4. Els desordres metabòlics.

El metabolisme és el conjunt de reaccions químiques que tenen lloc en l'organisme i que s'organitzen en rutes metabòliques que responen als canvis i als senyals intra- i extracel·lulars. El catabolisme genera energia a partir de la glucòlisi, de la degradació proteica, de la degradació lipídica, de la respiració cel·lular, i de l'autofàgia. En canvi, l'anabolisme

consumeix energia per promoure el creixement i la diferenciació i per produir components com ara proteïnes i àcids nucleics.

El nombre de persones que pateixen desordres metabòlics ha incrementat dramàticament a tot el món en els últims anys i, en conseqüència, són necessàries noves estratègies terapèutiques per a combatre aquesta epidèmia creixent. L'obesitat, la síndrome metabòlica i la diabetis tipus 2 són tres patologies interrelacionades que comparteixen mecanismes d'aparició i evolució i que poden arribar a ocasionar complicacions cardiovasculars.

1.4.1. La resistència a la insulina.

La insulina és una hormona peptídica secretada pels illots de *Langerhans* del pàncrees. El gen *INS* codifica la proinsulina, que a partir de canvis realitzats a l'aparell de Golgi, es convertirà en la insulina. La insulina ajuda a mantenir nivells òptims de glucosa en sang: fa que les cèl·lules del teixit adipós, del fetge i del múscul captin la glucosa de la sang, suprimeix la degradació lipídica en el teixit adipós, promou la glucogènesi i la síntesi lipídica al fetge i activa la glucogènesi al múscul (Figura 4). Les accions de la insulina a nivell global en el metabolisme també inclouen l'augment de la replicació de l'ADN i la síntesi de proteïnes, i la modificació de l'activitat de nombrosos enzims.

La resistència a la insulina és aquell estat patològic en el qual l'organisme és incapaç de respondre de manera normal a les accions de la insulina. Aquesta alteració és el resultat de la desregulació d'un o diversos punts de la via de senyalització de la insulina, com per exemple el seu receptor específic o la fosforilació de substrats. La resistència a la insulina es basa sobretot en la inhabilitat del teixit adipós i del múscul per captar la glucosa i la inhabilitat del fetge per suprimir la formació de glucosa en resposta a concentracions creixents d'insulina [43]. En aquest estat de resistència es necessita més insulina per mantenir uns nivells de glucosa saludables en sang [44].

La insulina juga un paper central en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa i regula el metabolisme dels carbohidrats, els lípids i les proteïnes. Un estat de resistència a la insulina s'associa amb l'aparició dels desordres metabòlics. La identificació dels factors que contribueixen al desenvolupament de la resistència a la insulina és el primer pas per establir les bases moleculars d'aquesta resistència en els teixits perifèrics.

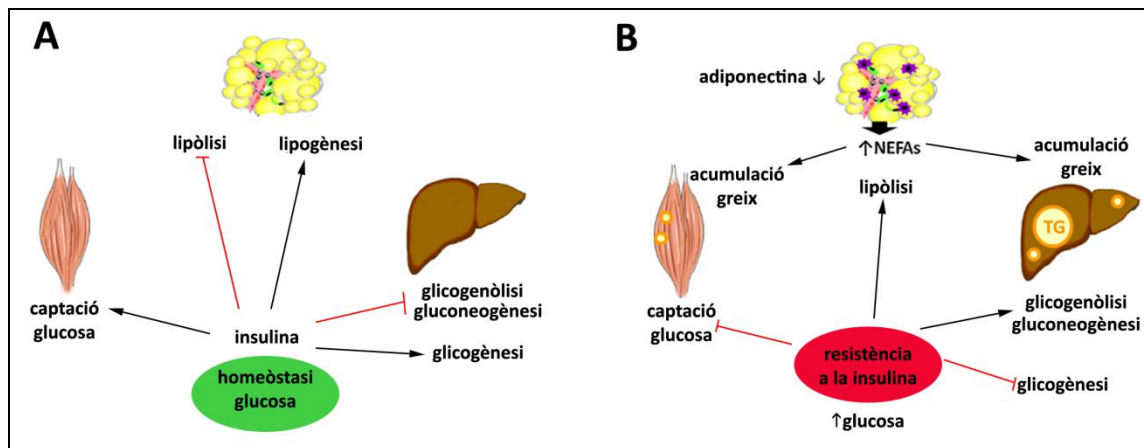


Figura 4. Relacions entre la insulina i els teixits adipós, hepàtic i muscular. **A)** En condicions normals la insulina regula el transport i el metabolisme de la glucosa dels teixits per mantenir la normoglicèmia. En concret, en el teixit adipós inhibeix la lipòlisi i incrementa la lipogènesi. En el fetge redueix la glicogenòlisi i la gluconeogènesi i augmenta la síntesi de glucogen. En el múscul principalment augmenta la incorporació de glucosa i la seva utilització. **B)** En condicions de resistència a la insulina es produeix la disfunció d'aquests processos. Es dona una relativa hiperglicèmia acompanyada d'un increment en plasma d'àcids grassos no esterificats produïts en el teixit adipós, una reducció de la secreció de l'adipocina anomenada adiponectina, i dona lloc a una acumulació ectòpica de greix. (NEFAs: àcids grassos no esterificats, TG: triglicèrids). Adaptació de Lafontan [45].

1.4.2. L'obesitat.

L'obesitat es defineix com un excés de greix corporal o una sobrecàrrega d'adipòcits manifestada per un excés de pes i volum corporal. El pes corporal s'ha utilitzat com a mesura indirecta del grau d'adipositat per raons pràctiques, ja que aquest grau d'adipositat no és fàcil de mesurar amb proves habituals o de rutina. L'índex de massa corporal (IMC) delimita els punts de tall per a definir l'obesitat. L'IMC es calcula com el pes (en quilograms) dividit per l'alçada (en metres) al quadrat. L'ús de l'IMC es va establir a la dècada dels 80. Existeixen estàndards per a nens, adolescents i adults. Es considera que un nen presenta obesitat amb un IMC estandarditzat per edat i sexe de +2 desviacions estàndard, i en el cas dels individus adults correspon a un IMC > 30 kg/m².

L'obesitat és una malaltia crònica, complexa i multifactorial que sol iniciar-se en la infància i l'adolescència i dona origen a múltiples problemes de salut, sobretot en l'edat adulta. La detecció precoç de l'obesitat infantil és important per frenar la progressió de la malaltia i evitar-ne la morbiditat i mortalitat associades. L'obesitat s'està imposant com el problema de salut pública més seriós del segle XXI. Agafant com a referència els estàndards de la OMS, l'estudi ALADINO [46] ha determinat que a l'Estat espanyol hi ha un 26% de nens amb sobrepès i un 18% de nens amb obesitat.

Es creu que la interacció entre la genètica i l'ambient en són les causes principals. Evolutivament parlant, es pot pensar que l'obesitat es veu afavorida per l'evolució dels gens, els quals preparen l'organisme per situacions de penúria però no d'opulència. Segons la teoria del gen estalviador, doncs, els gens afavoririen l'estalvi d'energia per maximitzar l'eficiència metabòlica. Els factors ambientals, però, són molt importants ja que poden establir un desequilibri conductual en la ingesta (presència de sobrealimentació) i la despesa energètica (hàbits de sedentarisme) [47].

Les alteracions metabòliques típiques dels pacients obesos són: l'adipositat central, la resistència a la insulina, les concentracions baixes de colesterol HDL i altes de triglicèrids, així com la presència d'hipertensió arterial (HTA). El perfil metabòlic de pacients amb alteracions greus i alt risc metabòlic es correlaciona de manera directa amb la quantitat de teixit adipós visceral que presenten, però no subcutani. Per tant, tot i ser veritat que l'obesitat incrementa el risc de patir malalties cròniques, és clar que són els pacients amb obesitat visceral els que formen el subgrup d'individus amb les alteracions més greus del metabolisme.

Existeix una associació entre la resistència a la insulina i l'obesitat. Es coneix que l'expressió alterada de certes proteïnes amb funció endocrina per l'excés de teixit adipós provoca efectes perjudicials en altres teixits perifèrics sensibles a la insulina. D'aquesta manera un excés de greix contribueix al desenvolupament de la resistència a la insulina. L'obesitat, juntament amb la resistència a la insulina i la hiperlipèmia que té associades, són les principals característiques de la síndrome metabòlica i són de risc per al desenvolupament de la diabetis tipus 2.

Donat que la prevalença de l'obesitat ha incrementat a un ritme alarmant durant les últimes dècades, és de vital importància entendre els mecanismes a través dels quals es programa aquest procés. Els primers mesos del període postnatal són una finestra de temps crítica per a la programació de l'obesitat, i per tant és aquest primer període de temps que necessita dianes d'intervenció.

1.4.3. La síndrome metabòlica.

La síndrome metabòlica (SM) es determina per un augment de l'adipositat abdominal i la conseqüent resistència a la insulina; la qual cosa condueix a un risc elevat de diabetis tipus 2 i malalties cardiovasculars.

La definició de la síndrome metabòlica en nens i adolescents (segons el criteri NCEP-ATPIII) i en adults (segons la Federació Internacional de Diabetis [IDF]) és aquella síndrome diagnosticada

quan un individu reuneix més de 3 de les 5 característiques representades en la taula següent (Taula 2). Així doncs, la síndrome metabòlica es caracteritza per la dislipèmia (augment de triglicèrids, lipoproteïnes i colesterol LDL, i disminució de colesterol HDL), la hipertensió arterial, la hiperglucèmia i un major percentatge de massa grassa abdominal. També es valoren paràmetres com el quocient leptina/adiponectina, marcadors d'inflamació com la proteïna C reactiva o marcadors de trombosis com el fibrinogen i l'inhibidor del l'activador de plasminogen.

Taula 2. Paràmetres i rangs per a determinar la síndrome metabòlica.

Paràmetre	Nens i adolescents	Adults
Perímetre abdominal	Excedeix el percentil 90 estandarditzat per edat i sexe	Excedeix el percentil 90 estandarditzat per edat i sexe
Triglicèrids	≥110 mg/dL	≥150 mg/dL
HDL-colesterol	<40 mg/dL	<40 mg/dL en homes i <50 mg/dL en dones
Pressió sanguínia sistòlica o diastòlica	Excedeix el percentil 90 estandarditzat per edat i sexe	PS ≥130 mmHg o PD ≥85 mmHg
Glucosa en dejú	≥110 mg/dL o presència de diabetis	≥100 mg/dL o presència de diabetis

L'adipositat abdominal o central, característica de la síndrome metabòlica, comporta un augment dels àcids grassos lliures en sang i la inhibició de l'acció de la insulina en els teixits perifèrics. La gran quantitat d'àcids grassos no esterificats (NEFAs) redueix la utilització de la glucosa pel múscul esquelètic i estimula la producció hepàtica de lipoproteïnes de molt baixa densitat i també la producció de glucosa, que potencia la secreció aguda d'insulina. L'efecte lipotòxic a llarg termini dels àcids grassos lliures en les cèl·lules beta del pàncrees podria ser part del nexa entre la resistència a la insulina, l'obesitat i el desenvolupament de diabetis tipus 2.

Els altres factors que influeixen en l'aparició de la SM són l'edat, els condicionants genètics o els antecedents familiars i un estil de vida inadequat, en el que s'inclou: la inactivitat física, el tabaquisme i el consum d'aliments hipercalòrics i rics en greixos saturats, hidrats de carboni concentrats i sal.

El risc de patir diabetis tipus 2 i malalties cardiovasculars augmenta en presència de SM seguint el criteri de diagnòstic de la mateixa i no equival a la suma del risc dels factors que la componen per separat. És a dir, el risc metabòlic de la SM és un efecte sinèrgic i no només la simple addició dels factors que la componen individualment. A més, de manera freqüent, la SM progressa i culmina en el desenvolupament de la diabetis tipus 2, factor que també se suma al risc cardiovascular.

1.4.4. La diabetis tipus 2.

La diabetis mellitus tipus 2 (DM2) és una malaltia metabòlica que presenta defectes en l'acció de la insulina en els teixits perifèrics i resulta en l'aparició d'hiperglucèmia crònica. Aquesta hiperglucèmia crònica pot anar acompanyada de lesions a múltiples teixits com danys en els vasos de la retina, els ronyons i els nervis perifèrics; a més a més d'un risc important en el desenvolupament de malalties cardiovasculars.

La DM2 s'ha convertit en un dels problemes sanitaris més greus actualment i s'estima que hi ha uns 246 milions de persones afectades a tot el món, dada que representa aproximadament un 20% de la població mundial major de 50 anys. A l'Estat espanyol la prevalença mitjana de DM2 en persones majors de 18 anys se situa aproximadament en el 13%; tot i que per sobre els 75 anys la prevalença és del 40% [48].

La DM2 és un altre exemple d'una malaltia en la qual tant la genètica com l'ambient són determinants i contribueixen en la seva patogènesi. Molts estudis suporten el paper dels factors fisiològics i l'estil de vida en l'etiologia de la DM2. Aquests factors inclouen la inactivitat física i l'obesitat, en concret, l'obesitat abdominal.

Els factors ambientals poden contribuir en la seva patogènesi des del desenvolupament fetal. Estudis recents han mostrat que el baix pes al naixement està associat a major prevalença de resistència a la insulina, intolerància a la glucosa i incidència de DM2 [49].

1.5. Els teixits de regulació metabòlica.

Els mecanismes de programació metabòlica convergeixen en l'alteració de l'acció de la insulina. Els principals teixits de regulació metabòlica implicats en aquesta programació són el teixit adipós, el teixit hepàtic i el teixit muscular que modulen a nivell corporal el metabolisme de la glucosa, dels lípids i de les proteïnes.

1.5.1. El teixit adipós.

El teixit adipós és un teixit connectiu lax format majoritàriament per adipòcits. La seva funció principal és emmagatzemar energia en forma de greix servint com a reserva de nutrients, tot i que també protegeix i aïlla el cos. No obstant, la seva funció més important és regular el balanç energètic i l'homeòstasi nutricional.

El teixit adipós està format per adipòcits i teixit connectiu altament vascularitzat i innervat on també trobem macròfags, cèl·lules endotelials, fibroblasts i leucòcits. La composició multivariada del teixit adipós fa que sigui un important mediador en el metabolisme i en la inflamació. Els adipòcits presenten la capacitat d'acumular àcids grassos en forma de triglicèrids quan hi ha un excés d'energia i d'alliberar-los en forma d'àcids grassos lliures en cas de necessitat energètica. Per dur a terme aquestes accions, els adipòcits contenen tots els enzims necessaris per a la lipòlisi i la lipogènesi. La composició del teixit adipós canvia dramàticament durant la sobrenutrició, involucrant alteracions en el nombre i mida dels adipòcits, el tipus i nombre de cèl·lules immunes i en la matriu extracel·lular [50]. El teixit adipós que es va expandint a causa de l'acumulació excessiva de greixos pot arribar a un estat d'hipertrofia. L'expansió patològica del teixit adipós es caracteritza per adipòcits grans i disfuncionals que provoquen inflamació i alteren la secreció d'adipocines i citocines. Aquesta expansió patològica de la massa grassa es relaciona també amb un nombre baix d'adipòcits progenitors capaços de proliferar i diferenciar-se en adipòcits sans [45].

El teixit adipós també és un important òrgan endocrí que secreta adipocines pro i antiinflamatòries. Es comunica així amb cèl·lules d'altres teixits distants com l'hipotàlem, el pàncrees, el fetge, el múscul esquelètic, els ronyons, l'endoteli i el sistema immunitari. D'aquesta manera el teixit adipós juga un paper principal en la regulació del metabolisme, i una secreció desregulada afecta l'homeòstasi de la glucosa i la insulina a nivell corporal [50]. Algunes de les adipocines més importants són: la leptina, l'adiponectina, la visfatina i el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa). Els agents proinflamatoris promouen la inflamació sistèmica, i a més els adipòcits hipertrofiats amb alt contingut lipídic que moren i alliberen el seu contingut al medi exterior faciliten també el reclutament de neutròfils i macròfags. La insulina actua de diferents maneres per bloquejar la lipòlisi, però bàsicament redueix els nivells intracel·lulars de AMP cíclic (AMPC) i bloqueja l'activació de la proteïna cinasa A (PKA) [50].

El greix corporal o teixit adipós presenta diferències segons si es troba localitzat sota la pell, anomenat teixit adipós subcutani o bé al voltant dels òrgans interns, anomenat teixit adipós visceral. L'acumulació de greix visceral, i no de subcutani, està associada amb les malalties metabòliques [51]. També hi ha diferències regionals pel que fa a la secreció d'adipocines i nivells de lipòlisi i síntesi de triglicèrids [50].

En humans el teixit adipós es desenvolupa en la setmana 14 de gestació, encara que el temps precís d'aparició depèn en certa manera del creixement del fetus. La proliferació del teixit

adipós tendeix a minimitzar-se al final de la gestació, i postnatalment incrementa fins aproximadament l'edat de 10 anys i aproximadament el 8% dels adipòcits son renovats cada any. En canvi, en rosegadors tot el greix visceral es desenvolupa postnatalment i és visible a partir del dia 7 de vida, les acumulacions de greix visceral principals són el greix visceral perigonadal, mesentèric i retroperitoneal i el 0.6% dels adipòcits són renovats diàriament. L'estudi del teixit adipós perigonadal o retroperitoneal en rates és el més equivalent a l'estudi del teixit adipós visceral en humans [52].

1.5.2. El teixit hepàtic.

El fetge és un òrgan de l'aparell digestiu que juga un paper clau en el metabolisme, doncs intervé en la síntesi de les proteïnes del plasma, en la depuració de toxines de l'organisme i en el metabolisme dels carbohidrats i dels lípids.

El fetge està format per hepatòcits o cèl·lules de parènquima, que representen el 80% del volum del fetge i gairebé el 60% del nombre total de cèl·lules, i per cèl·lules no parenquimàtiques. Hi ha dos grans vasos sanguinis que es connecten al fetge: l'artèria hepàtica que rep la sang des de l'artèria aorta, i la vena porta que duu la sang amb nutrients procedents del tracte gastrointestinal, de la melsa i del pàncrees al fetge. El fetge és la glàndula més grossa del cos humà i el segon òrgan més gran del cos, només superat per la pell. Es troba sota el diafragma, a la part dreta de l'abdomen. En humans adults en condicions no patològiques pesa aproximadament un quilogram i mig. El fetge sintetitza la bilis, important per a la emulsió i digestió dels lípids.

El fetge té un paper molt important en el metabolisme dels carbohidrats. Un augment dels nivells de glucosa circulants provoquen l'activació de la glucogènesi per a la formació i emmagatzematge de glucogen. Quan apareix un desordre metabòlic i s'activen en major proporció la gluconeogènesi i la glucogenòlisi en el fetge, es parla d'insulinorresistència [53]. Llavors la insulina no és capaç d'inactivar la producció de glucosa hepàtica, provocant així la hiperglucèmia observada en la diabetis tipus [53].

El fetge també intervé en el metabolisme lipídic ja que és la localització principal per a la lipogènesi o síntesi de lípids *de novo*. Els àcids grassos provinents de la dieta o els NEFAs originats per la hidròlisi dels triglicèrids emmagatzemats en el teixit adipós són esterificats en el fetge convertint-se en triacilglicèrids, i s'alliberen al torrent sanguini per a la seva posterior acumulació en el teixit adipós. Durant l'acumulació de greix excessiu en l'evolució de l'obesitat, es produeix un desequilibri entre la captació i la oxidació dels àcids grassos en el fetge. Aquest

desequilibri es caracteritza per un augment de la lipogènesi i la producció de triglicèrids en el fetge, alts nivells de triglicèrids circulants i l'acumulació ectòpica de greix: tant en el fetge, on contribuirà a la insulinoresistència hepàtica, com en localitzacions del cos, com ara en les artèries, on contribuirà a l'augment del risc de malalties cardiovasculars [54]. Definim un fetge sà quan aquest conté menys del 5% de greix, i en canvi quan el greix acumulat en el fetge sobrepassa aquest percentatge parlem del fetge gras o malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD, sigles en anglès). Aproximadament el 60% dels adults que presenten obesitat i diabetis tipus 2 també presenten la malaltia del fetge gras [55].

1.5.3. El teixit muscular.

El teixit muscular és el teixit contràctil del cos i està constituït per fibres musculars llises o estriades. El múscul llis forma part dels òrgans i estructures internes; i el múscul estriat pot ser cardíac, el qual forma part del cor, o bé esquelètic, el qual forma part del sistema locomotor i té funcions de locomoció i sosteniment.

El múscul esquelètic està format per cèl·lules musculars que contenen miofibril·les que presenten sarcòmers que es componen d'actina i miosina. La contracció muscular es genera pel moviment de l'actina contra la miosina gràcies a l'estimulació dels impulsos elèctrics facilitats per l'acetilcolina i transmesos a través dels nervis motors. L'activitat muscular s'emporta la major part de l'energia consumida pel cos i capta la majoria de la glucosa disponible. El múscul és la localització principal per disposar de glucosa sota estimulació de la insulina ja que és el major teixit d'emmagatzematge de glucogen, amb 4 vegades més capacitat d'emmagatzematge que el fetge [56]. En moments de necessitat energètica el glucogen és metabolitzat aeròbiamment per obtenir energia en forma d'ATP. Excepcionalment, també pot ser metabolitzat anaeròbiamment a través de la glucòlisi, produint però menys ATP.

Per la seva gran captació de glucosa, el múscul esquelètic és un teixit insulinosensible clau i fortament involucrat en el desenvolupament de la resistència a la insulina sistèmica [3]. Les recomanacions de salut pública reconeixen l'activitat física regular com una prevenció, gestió i tractament de condicions com l'obesitat, la diabetis tipus 2 i les malalties cardiovasculars [56]. L'activitat física incrementa la captació de glucosa del múscul, fins i tot independentment de la insulina, cosa que indica que la contracció muscular directament contribueix a l'homeòstasi de la glucosa [56].

En els desordres metabòlics com l'obesitat o la diabetis tipus 2, el múscul esquelètic no respon adequadament a la senyalització de la insulina, la qual cosa provoca una disminució de la

captació de la glucosa per aquest teixit. Alguns dels mecanismes descrits en la insulinoresistència del múscul esquelètic són la disminució de la fosforilació del receptor de la insulina o fosforilació reduïda dels substrats del receptor de la insulina [57].

Aquesta condició d'insulinoresistència muscular també es troba associada a l'augment de greix corporal i al dipòsit ectòpic de lípids intramusculars [58]. Evidències recents suggereixen que la insulinoresistència en el múscul podria ser un esdeveniment previ a l'acumulació de greix en el fetge. Els individus insulinoresistents presenten una disminució de la síntesi de glucogen en el múscul, cosa que incrementa llavors la lipogènesi *de novo* en el fetge i els nivells de triglicèrids en sang [59]. S'ha observat que la supressió de la síntesi de glucogen i l'activació del metabolisme dels lípids en el múscul es dona mitjançant l'activació d'AMPK [60]. Igualment, l'acció de la insulina atenuada en el múscul contribueix a la disminució de la capacitat oxidativa mitocondrial i a l'augment de l'acumulació de lípids intramusculars, així com també a l'augment d'acumulació de greix i expansió del teixit adipós.

1.6. Gens implicats en el metabolisme energètic.

En aquest treball s'han estudiat tres gens determinats, els quals participen en el metabolisme energètic: els gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1*.

1.6.1. El gen *STK11*.

El gen *STK11* (o *LKB1*) codifica per a una serina-treonina cinasa que fosforila i activa una sèrie de cinases. El gen *STK11* és també un supressor tumoral, i a més es troba mutat o deletat en la síndrome Peutz-Jeghers i en la majoria de càncers. El gen *STK11* realitza múltiples funcions cel·lulars i regula el metabolisme energètic cel·lular, el desenvolupament embrionari (desenvolupament i homeòstasi de diversos òrgans), la polaritat cel·lular, el cicle cel·lular, la proliferació cel·lular i l'apoptosi. Cal esmentar que els models animals amb deleció constitutiva del gen *STK11* no són viables [61].

El gen *STK11* és un mediador essencial per a la viabilitat cel·lular en estats de baixa energia. L'*STK11* protegeix les cèl·lules de l'apoptosi en resposta als agents i/o estímuls que augmenten l'AMP intracel·lular, actuant així com un punt de control de la disminució de l'energia cel·lular [62]. Les cèl·lules que no expressen *STK11* són hipersensibles a l'apoptosi induïda per estrès energètic [62]. La proteïna *STK11* té majoritàriament una localització citoplasmàtica, tot i que també es pot trobar a nivell nuclear.

El gen *STK11* regula la proteïna cinasa activada per AMP (AMPK) en múltiples tipus cel·lulars; la proteïna *STK11* actua constitutivament fosforilant el residu Thr-172 de la proteïna AMPK quan la concentració d'AMP cel·lular augmenta [62][63][64]. L'AMPK és l'enzim clau que regula l'estatus energètic cel·lular, el creixement, la inflamació i la funció mitocondrial [65]. La proteïna AMPK és un sensor de l'energia cel·lular i s'activa pels estímuls que augmenten el quocient AMP/ATP cel·lular mitjançant *STK11*. Alguns d'aquests estímuls que augmenten el quocient AMP/ATP són agents estressants cel·lulars com el dany oxidatiu, xoc osmòtic, hipòxia i privació de glucosa; així com també estímuls fisiològics com l'exercici, la contracció muscular i la senyalització hormonal, incloent-hi l'adiponectina [62].

L'AMPK actua per restaurar els nivells de glucosa en sang i els nivells cel·lulars d'ATP per retornar a un estat d'homeòstasi. Per fer-ho, estimula vies que incrementin la producció d'energia, com ara el transport de glucosa i la oxidació d'àcids grassos; i inhibeix les vies que consumeixen energia, com ara la lipogènesi, la síntesi proteica i la gluconeogènesi (Figura 5). Per això l'AMPK és una diana terapèutica potencial per a situacions de resistència a la insulina, i de fet és ja una diana per a fàrmacs existents i hormones que milloren la sensibilitat a la insulina.

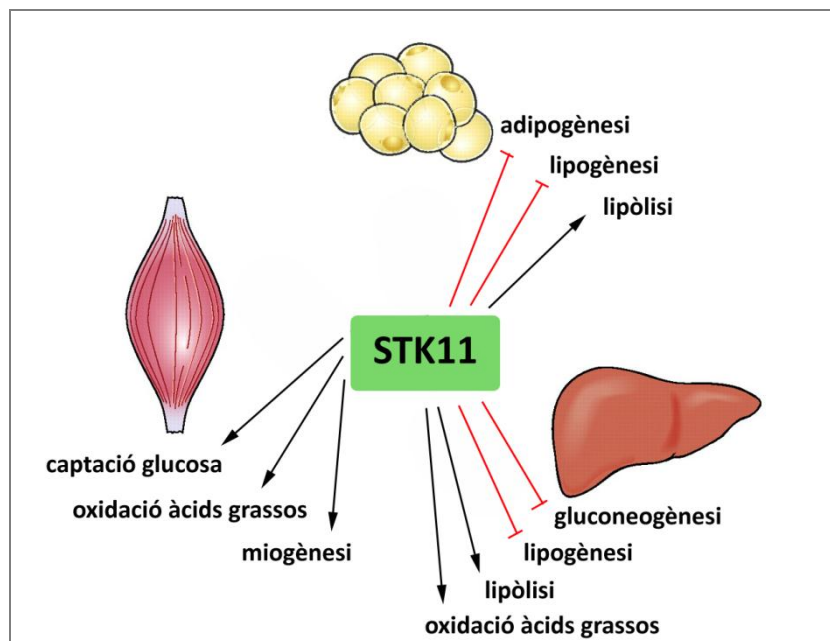


Figura 5. Resum de les accions del gen *STK11* en el metabolisme del teixit adipós, fetge i múscul.

La proteïna cinasa AMPK i la proteïna *STK11*, són dues serina-treonina cinases ben conservades evolutivament i entre espècies. Aquestes dues proteïnes regulen processos metabòlics i per tant són dianes terapèutiques potencials per al tractament de l'obesitat i de la diabetis tipus 2 [66][67].

1.6.1.1. Efectes del gen *STK11* en el teixit adipós.

S'ha descrit que l'activació d'AMPK en el teixit adipós també es duu a terme a través de *STK11* [63]. En el teixit adipós, *STK11* controla l'adipogènesi a través d'AMPK i la via de senyalització de IRS1/AKT [68]. En ratolins exposats a dieta obesogènica s'ha observat una reducció del contingut de proteïna *STK11* en el teixit adipós i nivells de senyalització menors de *STK11*-AMPK en el teixit adipós [69].

1.6.1.2. Efectes del gen *STK11* en el teixit hepàtic.

En el fetge de rata s'ha mostrat que la restricció calòrica activa *STK11* [65]. S'ha estudiat que la deleció específica de *STK11* en el fetge incrementa tant la gluconeogènesi com la lipogènesi, i els dos processos es troben involucrats en la despesa energètica [61]. El mecanisme inclou la fosforilació del coactivador 2 de transcripció regulat per *CREB* (*CRTC2* o *TORC2*) per *STK11*-AMPK [61].

1.6.1.3. Efectes del gen *STK11* en el teixit muscular.

En el múscul, la via de senyalització *STK11*-AMPK és la responsable dels canvis metabòlics que es produeixen en el teixit per al metabolisme dels lípids i la captació de glucosa [62][70]. En ratolins *knock-out* de *STK11* en el múscul esquelètic s'observa que es redueix l'activació d'AMPK i la captació de glucosa en resposta a la contracció muscular [71]. L'absència d'*STK11* en el múscul causa defectes en la diferenciació miogènica i una disminució de l'expressió d'actina i de la formació de fibres d'actina en el múscul [61]. En el múscul esquelètic, l'AMPK controla la sensibilitat a la insulina sota restricció calòrica a través de la fosforilació de mTOR i l'activació de SIRT1.

1.6.1.4. Agents terapèutics i el gen *STK11*.

Molts agents terapèutics per a la resistència a la insulina i la diabetis actuen estimulant la proteïna AMPK [64]. Dos dels fàrmacs més utilitzats per al tractament de la diabetis tipus 2 són la metformina (de la família de les biguanides) i la rosiglitazona [de la família de les tiazolidindiones (TZDs)] [70].

La metformina és un fàrmac antidiabètic utilitzat des de fa 40 anys que mimetitzava l'acció cel·lular de la restricció calòrica: redueix els processos cel·lulars que consumeixen energia,

incloent-hi la proliferació cel·lular [72]. La metformina actua a través de l'eix STK11-AMPK activant AMPK [61][73].

En rates tractades amb pioglitazona s'ha observat un augment de l'activitat d'AMPK en el teixit adipós i estudis amb rosiglitazona han mostrat una activació de la via de senyalització de l'AMPK en el múscul esquelètic [63]. Tot i que les TZDs tenen una varietat d'efectes beneficiosos en el teixit adipós, incloent la sensibilització a la insulina, la inducció del teixit adipós marró i l'inici de processos antiinflamatoris, no són usats de manera extensa per la presència d'efectes secundaris. Cal, per tant, estudiar nous gens i buscar noves dianes terapèutiques.

1.6.2. El gen *DLK1*.

El gen *DLK1* (o *PREF-1*) és un gen empremtat maternalment i localitzat al domini *DLK1-DIO3*. Codifica per a un factor de creixement epidèrmic que es troba com una proteïna transmembrana, i la seva forma soluble biològicament activa s'origina a partir del trencament proteolític d'aquesta molècula.

El gen *DLK1* té un paper important en l'adipogènesi, la neurogènesi, l'hematopoesi i la progressió d'alguns tipus de càncer [74][75][76]. *In vivo*, s'ha observat com els ratolins amb deleció de *DLK1* mostren una acumulació accelerada de greix, mortalitat perinatal i retard de creixement amb diferents malformacions esquelètiques. Aquests estudis mostren la importància del gen *DLK1* durant el desenvolupament fetal i el desenvolupament del teixit adipós [77].

L'expressió del gen *DLK1* es troba àmpliament distribuïda durant el desenvolupament embrionari, amb elevades expressions en la placenta, el fetge, el teixit adipós i el múscul esquelètic, entre d'altres [78] (Figura 6). En canvi en adults, l'expressió abundant es manté restringida al teixits neuroendocrins, el pàncrees i els òrgans reproductors, tot i que en els altres teixits es manté en diversos tipus cel·lulars progenitors per a les funcions de maduració i regeneració [75][76].

Tant en humans com en models murins, el gen *DLK1* es troba empremtat de manera materna, és a dir, se n'expressa la còpia paterna a través de metilació diferencial [78]. En models animals sense expressió paterna de *DLK1* s'observa un augment de l'adipositat accelerada [74].

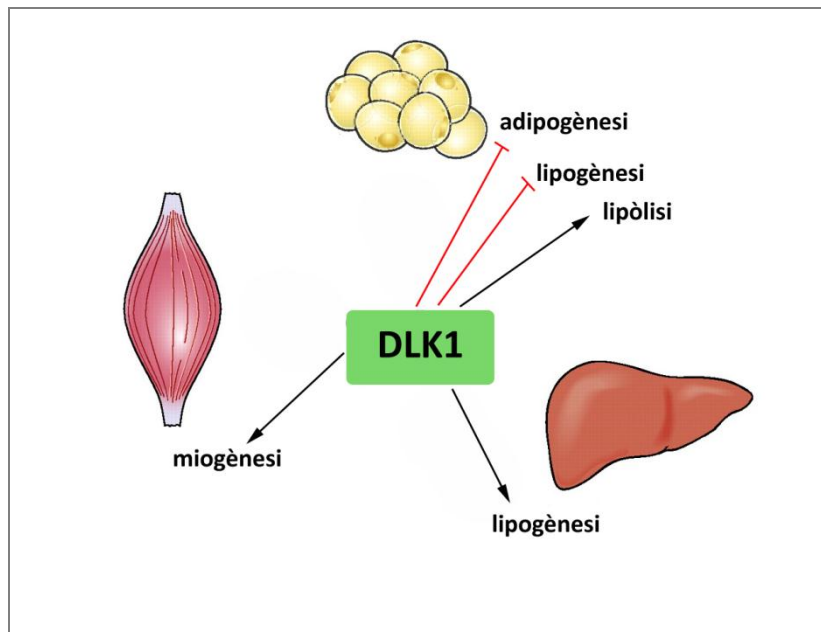


Figura 6. Resum de les accions del gen *DLK1* en el metabolisme del teixit adipós, fetge i múscul.

1.6.2.1. Efectes del gen *DLK1* en el teixit adipós.

En el teixit adipós, el gen *DLK1* es troba fortament expressat en preadipòcits però és quasi indetectable en adipòcits madurs [78]. La proteïna *DLK1* és secretada pels preadipòcits i inhibeix la diferenciació dels adipòcits. Els canvis o alteracions en el nombre d'adipòcits es produeixen gràcies a la diferenciació dels preadipòcits que serveixen de font renovable d'adipòcits madurs, per això totes les espècies mantenen l'habilitat de diferenciar preadipòcits al llarg de la vida en resposta a les demandes d'emmagatzematge de lípids. Així doncs, el gen *DLK1* inhibeix la diferenciació dels adipòcits mantenint així alguns preadipòcits per poder respondre davant un possible temps d'escassetat. Tots els processos de síntesi de lípids i desenvolupament del teixit adipós es troben sota control hormonal i nutricional [80]. En ratolins amb sobreexpressió de *DLK1* específicament en el teixit adipós s'observa una reducció en el volum del teixit [78]. En ratolins amb deleció específica de *DLK1* en el teixit adipós s'observa un augment de l'adipositat i el desenvolupament de fetge gras, amb un augment de l'expressió d'enzims lipogènics com *FASN* [78]. D'altra banda, ratolins amb deleció de *DLK1* presenten més guany de pes corporal i més massa grassa. L'anàlisi histològic d'aquestes acumulacions de greix mostren que els adipòcits dels ratolins sense *DLK1* presenten adipòcits més grans que els ratolins de fenotip salvatge. Els ratolins sense *DLK1* també presenten el fetge gras i nivells circulants de triglicèrids, colesterol i àcids grassos lliures més grans, totes elles característiques relacionades amb l'obesitat [79]. En els dos tipus de models animals, tant els ratolins amb sobreexpressió de *DLK1* com amb deleció del mateix, s'ha demostrat el desenvolupament de resistència a la insulina i intolerància a la glucosa, suggerint que el

correcte desenvolupament del teixit adipós i el seu funcionament adequat són crítics per mantenir l'homeòstasi de la glucosa i la insulina [79].

1.6.2.2. Efectes del gen *DLK1* en el teixit hepàtic.

El gen *DLK1* es troba involucrat en el creixement i la diferenciació en el teixit hepàtic [78]. En models animals s'ha observat que una sobreexpressió específica del gen *DLK1* en el fetge provoca un increment en l'expressió de gens adipogènics com *PPARgamma* i lipogènics com *FASN* [78] presentant globalment una reducció del greix corporal i suggerint un rol endocrí de *DLK1*. De manera normal, les cèl·lules hepàtiques que presenten expressió del gen *DLK1* són encara cèl·lules primàries o hepatoblasts que presenten un alt potencial proliferatiu i de diferenciació [78].

1.6.2.3. Efectes del gen *DLK1* en el teixit muscular.

Recentment, s'ha observat que el creixement i la regeneració postnatal del múscul esquelètic està regulat per les cèl·lules satèl·lit musculars amb combinació amb fibroblasts del teixit connectiu i preadipòcits intramusculars. Tot i que el gen *DLK1* es troba poc expressat en el múscul madur en repòs, es troba sobreexpressat en processos de regeneració muscular. A nivell molecular, una petita porció d'aquestes cèl·lules que presenten expressió de *DLK1* es troben involucrades en la remodelació del múscul sota condicions adverses en models animals [81]. Els preadipòcits intersticials també presenten lligands de superfície com la proteïna *DLK1*. La sobreexpressió de la proteïna *DLK1* provoca hipertròfia muscular [81]. La proteïna *DLK1* extracel·lular contribueix a la diferenciació miogènica; tot i que el nombre de miofibres per múscul està definit ja en estadis perinatals, el creixement postnatal del múscul pot modificar-ne la mida i la composició [81]. El gen *DLK1* es troba involucrat en el creixement i la diferenciació en el teixit muscular [78]. *DLK1* participa en la regulació del creixement de les fibres musculars durant el desenvolupament embrionari, i l'expressió persistent de *DLK1* en l'etapa postnatal contribueix a la hipertròfia muscular [78].

1.6.2.4. Agents terapèutics i el gen *DLK1*.

En el cas del gen *DLK1*, no s'ha descrit en la literatura cap agent terapèutic relacionat amb la seva via de senyalització. Tot i això, diversos estudis apunten que el gen *DLK1* pot ser una diana terapèutica potencial per evitar alguns processos com per exemple la diferenciació de cèl·lules del carcinoma hepatocel·lular, ja que s'ha descrit que la inhibició del gen *DLK1*

provoca la diferenciació de les cèl·lules tumorals [82], o bé la diferenciació en estadis embrionaris [83].

1.6.3. El gen *SIRT1*.

El gen *SIRT1* (o *Sir2*) codifica per a l'enzim més conegut i estudiat de la família de les proteïnes sirtuïnes. Les sirtuïnes són una família de desacetilases dependents de nicotinamida adenina dinucleòtid (NAD⁺) pertanyents al grup de desacetilases d'histones de classe III. Aquests enzims es troben localitzats al nucli, citoplasma o bé mitocòndria i actuen com a sensors cel·lulars de disponibilitat energètica. Es troben involucrats en la resposta cel·lular a condicions d'estrès i en la regulació de l'expressió gènica, reparació d'ADN danyat, metabolisme i supervivència [84].

El gen *SIRT1*, a través de la desacetilació de factors de transcripció i histones, juga un paper clau en la regulació de l'homeòstasi de la glucosa i els lípids (Figura 7), en el control de la secreció d'insulina, en l'apoptosi i l'autofàgia, en la resposta antiinflamatòria i en el control de l'estrès oxidatiu i, a més a més, es troba involucrada en la patofisiologia de les malalties metabòliques [85]. Estudis recents mostren que *SIRT1* controla la secreció d'insulina en el pàncrees i controla la disponibilitat de nutrients en l'hipotàlem [86]. Una deficiència de *SIRT1* en animals d'experimentació desencadena hiperglucèmia [87].

El gen *SIRT1* regula diferents factors de transcripció, coreguladors i enzims que milloren el control metabòlic en el teixit adipós, el fetge i el múscul, particularment durant l'obesitat i l'envelliment [88]. *SIRT1* confereix protecció contra malalties metabòliques relacionades amb l'edat, promou un envelliment més saludable i protegeix el fetge del dany carcinogen relacionat amb la síndrome metabòlica [84]. Recentment també s'han estudiat les proteïnes sirtuïnes com un possible mecanisme entre la disponibilitat de nutrients o el metabolisme energètic i les malalties relacionades amb l'envelliment, ja que es troba activada en resposta a la restricció calòrica i actua en múltiples dianes en un ampli ventall de teixits [84]. Es podria dir que l'enzim desacetilasa *SIRT1* és un sensor nutricional: disminueix dràsticament en períodes de sobrealimentació i en canvi presenta alts nivells en períodes de restricció calòrica.

La restricció calòrica, és a dir, la reducció de la ingesta alimentària al 30-40 %, està reconeguda en mamífers com una estratègia per allargar la vida, ja que retarda l'envelliment fisiològic i l'aparició de malalties relacionades amb l'edat. Molts estudis experimentals i clínics mostren que la sensibilitat a la insulina millora amb restricció calòrica [69].

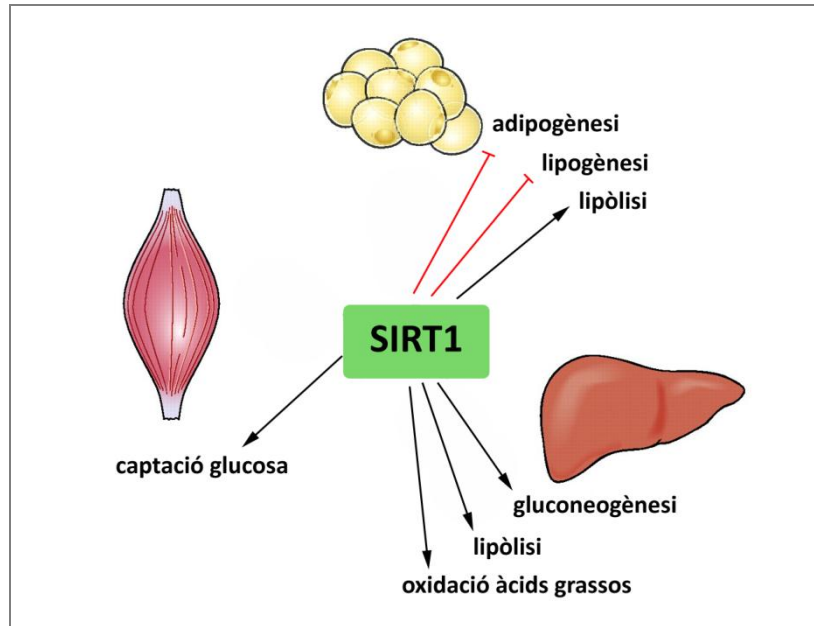


Figura 7. Resum de les accions del gen *SIRT1* en el metabolisme del teixit adipós, fetge i múscul.

Alguns dels possibles mecanismes d'aquest procés, a part de modular la senyalització de la insulina, inclouen l'activitat de la desacetilasa de la proteïna *SIRT1* així com la senyalització a través de *AMPK* per incrementar la producció d'ATP derivada de l'oxidació dels greixos [89]. De manera inversa, *AMPK* pot incrementar el nivell cel·lular de NAD^+ per promoure l'activitat de *SIRT1* [90]. Durant períodes extensos de restricció calòrica incrementen els nivells de NAD^+ , o bé el quocient NAD/NADH , i això fa que augmentin tant l'expressió com l'activitat de la desacetilasa *SIRT1* [65]. En estats de privació d'energia, l'enzim *SIRT1* és capaç d'unir-se a *PPARgamma* per inhibir-ne la seva activitat en el teixit adipós. En les mateixes condicions però en el fetge, el gen *SIRT1* regula processos com la lipogènesi, la oxidació dels àcids grassos i el metabolisme del colesterol [91]. Els mecanismes moleculars que mimetitzen el metabolisme resultant de la restricció calòrica poden ser inclosos com a noves dianes terapèutiques per a la resistència a la insulina i la diabetis tipus 2.

1.6.3.1. Els efectes de *SIRT1* en el teixit adipós.

En el teixit adipós, *SIRT1* promou la lipòlisi o mobilització dels greixos, la secreció de factors insulinosensibilitzants com l'adiponectina i també inhibeix l'adipogènesi [84]. A més, es coneix que l'activació de *SIRT1* protegeix els adipòcits contra la insulinoresistència induïda per *TNF-alfa* [84]. S'ha suggerit en diversos estudis amb models animals que les proteïnes sirtuïnes podrien estar involucrades en la determinació de la massa grassa a través de la regulació de

l'emmagatzematge de greixos [92]. L'expressió de *SIRT1* es troba disminuïda en el teixit adipós d'animals obesos [93]. Experimentalment, la supressió de *SIRT1* en adipòcits provoca una inflamació de baix grau crítica per al desenvolupament de l'obesitat [93].

1.6.3.2. Els efectes de *SIRT1* en el teixit hepàtic.

En el fetge, *SIRT1* controla el metabolisme de la glucosa i els lípids. S'observen alts nivells de *SIRT1* relacionats amb alts nivells d'oxidació d'àcids grassos, lipòlisi i gluconeogènesi en el fetge. En models animals de NAFLD s'ha observat una disminució en l'expressió de *SIRT1* en el fetge [84].

1.6.3.3. Els efectes de *SIRT1* en el teixit muscular.

En el múscul, el gen *SIRT1* augmenta la utilització de la glucosa i millora la sensibilitat a la insulina a través de la regulació de PI3K [92].

1.6.3.4. Agents terapèutics i el gen *SIRT1*.

Una estratègia recent per frenar la desregulació de les vies de senyalització del metabolisme energètic que desencadena resistència a la insulina i pot provocar l'aparició de diabetis tipus 2 és l'ús d'activadors de *SIRT1*.

El resveratrol, una substància polifenòlica present en el raïm i el vi negre, és un activador de *SIRT1*. S'ha observat que el resveratrol té efectes beneficiosos per a l'homeòstasi de la glucosa i la sensibilitat a la insulina en models animals de resistència a la insulina [65]. La resistència a la insulina promou l'aparició d'espècies oxigen reactives (ROS) i afavoreix un ambient proinflamatori que propicia la reducció de l'esperança de vida. Una disminució de l'activitat de la *SIRT1* podria ser un dels mecanismes que provoquen l'escurçament de l'esperança de vida en condicions de resistència a la insulina [94]. Per altra banda, el telmisartan, un antagonista de l'angiotensina II utilitzat en el tractament de la hipertensió arterial essencial, provoca una millora en la sensibilitat a la insulina en el múscul esquelètic, juntament amb una regulació positiva de l'ARN missatger de *SIRT1* i l'activació de AMPK [73]. I finalment la metformina, amb efectes beneficiosos en la prevenció i tractament de la insulinoresistència, també produeix una sobreexpressió i activació de *SIRT1* [90].

HIPÒTESIS

S'ha descrit que el creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal pot programar l'aparició de resistència a la insulina i de malalties metabòliques com l'obesitat, la diabetis tipus 2 i les malalties cardiovasculars en l'edat adulta. Malgrat tot es desconeixen el mecanismes d'aquesta programació.

- 1- Proposem que el creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal induït en el model animal experimental provocarà canvis moleculars en els teixits perinatals i postnatsals.
- 2- Proposem que els mecanismes moleculars d'aquesta programació fetal estaran relacionats amb l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal de les cries.
- 3- Proposem que els mecanismes moleculars d'aquesta programació fetal estaran relacionats amb l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit hepàtic de les cries.
- 4- Proposem que els mecanismes moleculars d'aquesta programació fetal estaran relacionats amb l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit muscular de les cries.
- 5- Proposem que els mecanismes moleculars d'aquesta programació fetal estaran relacionats amb l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit placentari.

OBJECTIUS

L'objectiu principal és estudiar els canvis moleculars en l'expressió dels gens relacionats amb el metabolisme energètic: *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* provocats pel creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal en rates.

Els objectius específics de la tesi són:

- 1- Dissenyar i establir un model animal de restricció fetal i un model de creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal mitjançant la modificació de la ingesta de les rates gestants i de les cries durant el creixement pre i postnatal.
- 2- Estudiar l'efecte del creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal en el metabolisme energètic mitjançant l'estudi de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal de les cries.
- 3- Estudiar l'efecte del creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal en el metabolisme energètic mitjançant l'estudi de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit hepàtic de les cries.
- 4- Estudiar l'efecte del creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal en el metabolisme energètic mitjançant l'estudi de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit muscular de les cries.
- 5- Estudiar l'efecte de la restricció prenatal en el metabolisme energètic mitjançant l'estudi de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit placentari.

MATERIAL I MÈTODES

4.1. Model d'experimentació animal.

Per al compliment dels objectius de la tesi es va dissenyar i utilitzar un model animal de restricció de creixement fetal, induït per restricció calòrica, i un de creixement recuperador postnatal, a través d'ingesta calòrica diferencial, en rates *Wistar*. El Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona va aprovar el protocol d'acord amb la llei 214/17 de la Generalitat de Catalunya.

Es va realitzar un model animal modificant l'aportació calòrica de la dieta per aconseguir una restricció fetal. Per a la realització del model animal amb rates *Wistar*, tres mascles i disset femelles verges (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) es van estabular individualment dues setmanes abans de l'aparellament i es van alimentar amb menjar estàndard de laboratori (Teklad Global Rodent Maintenance Diet, Harlan Laboratories Inc.; 14% proteïnes, 4% greixos, 2,900 kcal/kg). Durant els experiments, totes les rates gestants, i també les cries, es van estabular en les següents condicions: cicle de llum-fosc 12:12 hores, temperatura controlada de 21 ± 1 °C i humitat del 50% al 60%. En tots els casos, es va designar el dia 1 de gestació a partir de l'observació d'espermatozoides en el frotis vaginal de les rates femella realitzat a primera hora del matí després de la nit d'aparellament.

El model va constar de dues fases experimentals: una per assolir el model de restricció fetal i una altra per assolir el model de creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal.

El primer experiment va servir per establir el model de restricció fetal. En aquesta fase es va modificar la ingesta de les rates gestants per establir la restricció fetal. Aquest primer experiment va permetre recol·lectar els òrgans i els teixits de les rates gestants i les placentes mitjançant la tècnica de cesària, però no es va poder seguir el creixement de les cries, ja que la recol·lecció implicava el sacrifici de les rates gestants durant la cesària i per tant no podíem assegurar l'alletament ni la supervivència de les cries (Figura 8A).

El segon experiment va servir per establir el model de creixement recuperador postnatal secundari a restricció prenatal. En aquesta segona fase vam replicar la primera fase de restricció fetal amb unes altres rates gestants, i a més, mitjançant el part natural, vam assegurar el creixement de les cries i vam poder recol·lectar els òrgans i els teixits d'aquestes al final del període de 42 dies postnats (Figura 8B).

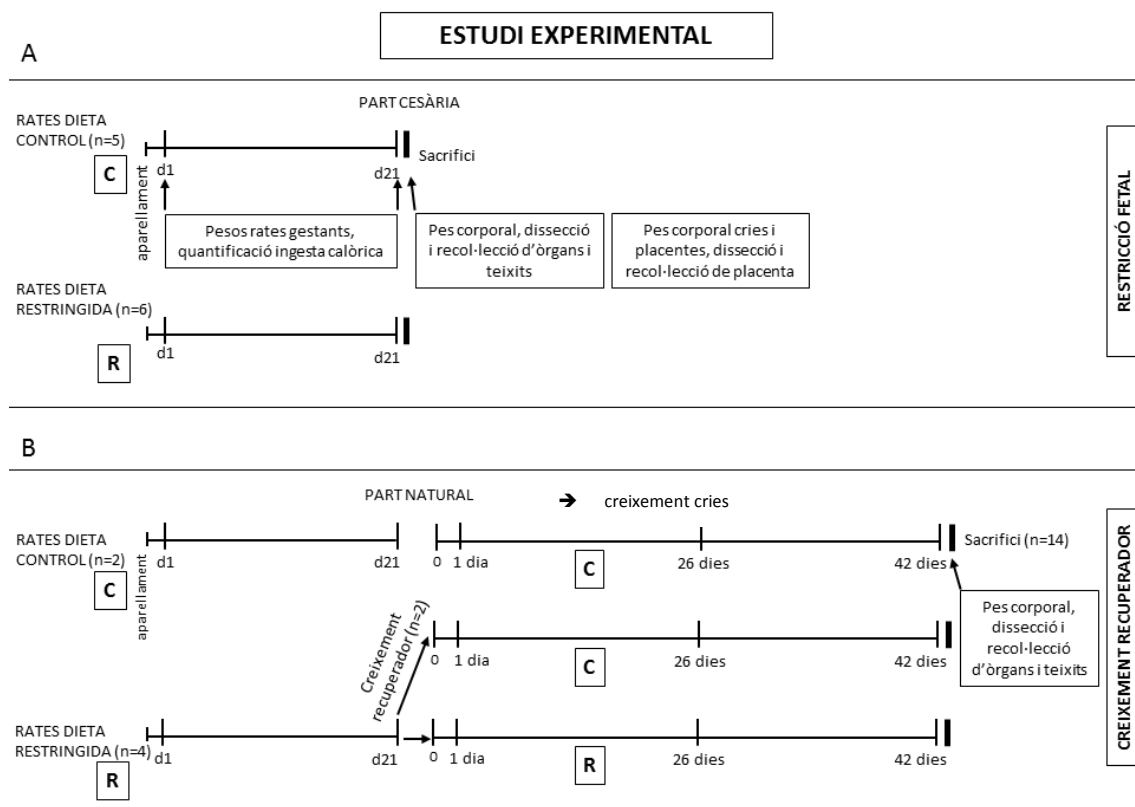


Figura 8. Disseny de l'estudi experimental. **A)** Disseny del model de restricció fetal i **B)** disseny del model de restricció fetal amb creixement recuperador postnatal. C: control, R: restringit.

4.1.1. Model de restricció fetal.

4.1.1.1. Animals i dieta prenatal.

Per al model de restricció fetal, es van distribuir aleatòriament les rates, gestants per primera vegada, a rebre una dieta control (C) amb menjar estàndard *ad libitum* o bé una dieta restringida (R) amb la qual les rates rebien el 50% de la ingesta de les gestants control (grup C: N=5 i grup R: N=6). Totes les rates van disposar d'aigua *ad libitum*. Es van aplicar les dietes des del dia 1 de la gestació fins al part a cada un dels grups. El pes corporal matern i la ingesta es van mesurar cada dia. Per recollir mostra de la placenta, les rates gestants van parir via cesària el dia 20 de la gestació.

4.1.1.2. Recol·lecció de la sang i els teixits perinatal.

El dia 20 de gestació es van anestesiar les rates gestants amb isofluorà al 4% per practicar-los la cesària. Es va comprovar l'eficàcia de l'anestèsia observant el reflex palpebral i de retirada de la pota. Les mostres de la placenta es van extreure, pesar i congelar

immediatament en nitrogen líquid i es van guardar a -80 °C. Es van pesar i sacrificar les cries per decapitació. Al final de la intervenció, es van sacrificar les rates gestants per exsanguinació cardíaca amb isofluorà al 6%.

Les mostres maternes de sang i teixits es van extreure i es van guardar a -80 °C. La sang es va recollir per punció cardíaca amb xeringues heparinitzades i es va centrifugar a 3000 rpm durant 15 minuts a 4 °C per obtenir la mostra de plasma que es va guardar a -80 °C. També es van dissecar i pesar els teixits (fetge, ronyons, pàncrees, teixit adipós [retroperitoneal, mesentèric i perigonadal] i múscul esquelètic) de les rates gestants per a posteriors estudis. La massa grassa visceral es va estimar a partir de la suma dels pesos dels teixits adiposos retroperitoneal, mesentèric i perigonadal obtinguts per dissecció com una aproximació de la composició del greix visceral [95].

4.1.2. Model de creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal.

4.1.2.1. Animals i dieta postnatal.

Per al model de creixement recuperador postnatal secundari a restricció fetal vam utilitzar la modificació de la ingesta materna en el període de gestació, per assolir la restricció fetal, i llavors la modificació de la ingesta de la mare també en el període d'alletament i de creixement postnatal de les cries, per assolir el creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal.

Per a la restricció fetal durant la gestació es van replicar les condicions de l'experiment anterior: vam distribuir les rates aleatòriament a rebre una dieta control (C) amb menjar estàndard *ad libitum* o bé una dieta restringida (R) amb la qual les rates rebien el 50% de la ingesta de les gestants control (grup C: N=2 i grup R: N=4). Totes les rates van disposar d'aigua *ad libitum*. Es van aplicar les dietes des del dia 1 de la gestació fins a terme a cada un dels grups. El pes corporal matern i la ingesta es van mesurar cada dia.

Per seguir el creixement postnatal de les cries, les rates gestants van parir per part natural i posteriorment, el dia 1 després del naixement, es van limitar les cries a 10 per llodrigada per normalitzar la cria durant l'alletament matern. En el mateix moment, es va categoritzar la descendència d'estudi en els grups de creixement recuperador postnatal o creixement postnatal control per administrar la nutrició corresponent a les rates mare durant l'alletament, com es detalla a continuació.

Després del part, i durant els 21 dies del període de lactància, es van administrar diferents dietes, control o restringida, a les mares lactants per crear tres grups experimentals. En aquests grups la primera lletra es refereix al tipus de dieta materna ingerida durant la gestació i la segona lletra es refereix al tipus de dieta materna ingerida durant l'alletament. Així doncs, durant la lactància, es van alimentar les rates mare control amb dieta *ad libitum* (grup CC; N=2 rates mare lactants) i en canvi es van alimentar les rates mare restringides bé amb una dieta *ad libitum* (grup RC; N=2 rates mare lactants) o bé amb una dieta restringida (grup RR; N=2 rates mare lactants) per crear els grups amb i sense creixement recuperador postnatal.

A les 3 setmanes i mitja d'edat, a dia postnatal 26, es van deslletar totes les cries dels grups i es van assignar a rebre una dieta *ad libitum*. Totes les cries es van pesar almenys dues vegades per setmana. El primer pes corporal es va mesurar el dia 1 després del naixement, i després es van mesurar els pesos següents als dies 5, 7, 12, 15, 20, 22, 26, 34 i 42.

Es va designar el dia postnatal 42 com a punt final de l'experiment, per evitar l'entrada en pubertat de les cries i poder estudiar-les en un període postnatal previ a la pubertat.

4.1.2.2. Recol·lecció de la sang i els teixits postnatsals.

A dia postnatal 42, es van sacrificar totes les cries (N=14 per grup; 7 femelles i 7 mascles per grup) prèviament dejunades per exsanguinació cardíaca amb isofluorà al 6%.

Les mostres de sang i teixits es van obtenir i es van congelar a -80 °C. La sang es va recollir per punció cardíaca amb xeringues heparinitzades, i es va centrifugar a 3000 rpm durant 15 minuts a 4 °C per obtenir la mostra de plasma que es va guardar a -80 °C. Els teixits (fetge, teixit adipós retroperitoneal i múscul esquelètic) es van dissecar i pesar i es van congelar immediatament en nitrogen líquid. Es va fer el mateix en la resta dels teixits (ronyons, pàncrees, teixit adipós [mesentèric i perigonadal] i teixit adipós marró) per a posteriors estudis. La massa grassa visceral de les cries es va estimar a partir de la suma dels pesos dels teixits adiposos retroperitoneal, mesentèric i perigonadal obtinguts per dissecció i la massa magra es va estimar restant el pes de tots els òrgans i teixits disponibles (fetge, ronyons, pàncrees i teixit adipós) del pes corporal de l'animal com una aproximació de la composició corporal real [95].

4.2 Determinació de marcadors metabòlics.

Per mesurar els marcadors metabòlics es va utilitzar el plasma de les cries recollit en el moment del sacrifici, a dia postnatal 42.

4.2.1 La glucosa i els lípids.

La glucosa, el colesterol total, el colesterol HDL i els triglicèrids es van determinar amb la tècnica de química seca.

La tècnica de química seca és un mètode que permet detectar i quantificar una substància mitjançant els canvis d'intensitat de coloració d'una tira reactiva de química seca a través de la reflexometria de la llum en una determinada longitud d'ona amb un aparell automatitzat. El mètode es basa en l'estabilització dels components de la reacció colorimètrica d'una determinada substància mitjançant l'assecat de les respectives solucions d'indicadors i reactius auxiliars en papers de filtre en un suport de material sintètic. Així doncs, una tira de química seca conté: el suport de material sintètic amb un codi magnètic a un extrem, un material de transport de la mostra i una sèrie de capes (fibra de vidre) que contenen els reactius. Per capil·laritat, la mostra ascendeix a través de les capes que contenen els reactius i es dona la reacció colorimètrica corresponent. Les condicions de la reacció són controlades per l'aparell. El codi de barres de cada tira serveix per identificar cada mostra i a més a més conté tota la informació que requereix l'aparell per realitzar la determinació específica d'una substància: temps de preincubació i de reacció, temperatura, longitud d'ona requerida, nombre de mesures i interval entre elles, càlcul de resultats i factors de conversió.

A partir de 100 microlitres de plasma dipositats en un cubeta de distribució de l'aparell que al·lquotava 5 microlitres de la mostra sobre les diferents tires de química seca es va realitzar l'assaig per a tots els paràmetres d'estudi (glucosa: *Code-33905-[Glu]*, colesterol total: *code-33907-[T-Cho]*, triglicèrids: *code-33908-[TG]* i colesterol HDL: *code-33923-[HDL-C]*, Spotchem II, Spotchem EZ SP-4410, Menarini Diagnostics-Akay, Japan).

4.2.2 La insulina.

La insulina es va determinar amb la tècnica d'assaig per immunoabsorció lligat a enzims (*ELISA*).

La tècnica d'*ELISA* és un mètode bioquímic que permet determinar una substància a partir de la seva detecció amb antígens o anticossos lligats a enzims que, amb l'addició d'un substrat específic, donen una reacció enzimàtica que produeix un senyal de color visible el qual es pot quantificar de manera automatitzada mitjançant un espectrofotòmetre. És una tècnica que utilitza l'alta especificitat i afinitat dels complexos antigen: anticòs per mesurar la presència i quantificar una substància en una mostra. Els *kits* comercials normalment presenten *sandwich*

ELISA, és a dir, els anticossos primaris, no lligats a enzim, que captaran la substància a determinar es troben adherits no covalentment en un suport de fase sòlida o placa de microtitulació de 96 cel·les o pous. En cadascuna de les cel·les o pous s'incuba la mostra per què els anticossos primaris captin l'antigen de la substància a determinar. Posteriorment, s'afegeix un anticòs secundari lligat a enzim que també s'unirà a l'immunocomplex. Finalment, afegint un substrat específic, es dona la reacció enzimàtica que genera un senyal de color que serà proporcional a la quantitat de substància present en la mostra i es podrà mesurar amb un espectrofotòmetre. Mitjançant la lectura a la longitud d'ona adequada per al substrat utilitzat s'obtenen uns valors d'absorbància o densitat òptica que són convertits a valors de concentració extrapolant-los en una recta patró de la substància específica a determinar assajada simultàniament amb les mostres d'estudi.

Per a l'assaig d'insulina (*Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA kit #90060*, Crystal Chem Inc., USA) es van incubar 5 microlitres de les mostres plasma i els determinats estàndards de la corba patró en la placa de 96 pous del kit durant 2 hores a 4 °C. Passat aquest temps, es van descartar les mostres i es van rentar els pous amb la solució de rentat a concentració 1X. Es van afegir 100 microlitres de l'anticòs amb l'enzim conjugat als pous i es va incubar la placa durant 30 minuts a temperatura ambient; i seguidament es va repetir el mateix pas de rentat. Finalment, es va afegir el substrat enzimàtic per què reaccionés colorimètricament durant uns 10 minuts en la foscor. Es va aturar la reacció afegint la solució de parada, i es va fer una lectura de cada pou a una longitud d'ona de 450 nanòmetres per obtenir un valor d'absorbància que, extrapolat a la corba patró, va donar un valor de concentració.

L'índex HOMA de resistència a la insulina (HOMA-IR) es va calcular a partir de la glucosa i la insulina, tal com havia estat descrit en estudis previs [96], utilitzant la fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = \text{glucosa (mg/dl)} * \text{insulina (uU/ml)} / 2430.$$

4.2.3 L'adiponectina.

L'adiponectina també es va determinar amb la tècnica d'ELISA.

Per a l'assaig de l'adiponectina total (*Rat Adiponectin ELISA Kit #80570*, Crystal Chem Inc., USA) es van incubar 5 microlitres de les mostres plasma i els determinats estàndards de la corba patró en la placa de 96 pous del kit durant 1 hora en agitació a temperatura ambient. Passat aquest temps, es van descartar les mostres i es van rentar els pous amb la solució de rentat a concentració 1X. Es van afegir 100 microlitres de l'anticòs amb l'enzim conjugat als pous i es va

incubar la placa durant 1 hora en agitació a temperatura ambient; i seguidament es va repetir el mateix pas de rentat. Finalment, es va afegir el substrat enzimàtic per què reaccionés colorimètricament durant uns 15 minuts en la foscor. Es va aturar la reacció afegint la solució de parada, i es va fer una lectura de cada pou a una longitud d'ona de 450 nanòmetres per obtenir un valor d'absorbància que, extrapolat a la corba patró, va donar un valor de concentració.

4.3 Expressió gènica: ARN.

Per observar els canvis d'expressió gènica en els diferents grups experimentals es va estudiar l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit retroperitoneal, en el fetge, en el múscul esquelètic i en la placenta. De la mostra de placenta es va seleccionar la zona laberíntica per als estudis moleculars (Figura 3).

4.3.1 Extracció d'ARN.

L'ARN total de les mostres dels diferents teixits es va extreure amb un kit comercial (RNAeasy mini kit, Qiagen).

4.3.1.1 Extracció d'ARN en la placenta, el fetge i el múscul.

Per a l'extracció de l'ARN total en la placenta, el fetge i el múscul, es va partir d'uns 30 mg de teixit en 600 microlitres de solució de lisi (*RLT buffer*) i un 1% de beta-mercaptoetanol (que desnaturalitza les proteïnes i facilita la lisi cel·lular). Es va posar la mostra congelada i els reactius en un tub d'assaig de 4 mil·lilitres de polipropilè i es va homogeneïtzar o *triturar* la mostra (*Ultra-turrax T25 basic*, IKA-Werke, GMBH&Co, Germany) durant uns 30-50 segons sense que s'escalfés (s'anava posant el tub en gel). Seguidament es va transferir la mostra a un tub de recollida estèril de 1.5 mil·lilitres, es va centrifugar a màxima potència durant 3 minuts i es va transferir el sobrenedant incolor, que contenia l'ARN dissolt, en un nou tub de recollida. Es va afegir 1 volum d'etanol al 70% (*Ethanol absolute*, NormaPur, VWR Chemicals, VWR Int, S.A.S.) i es va invertir el tub curosament. Es van transferir 650 microlitres de la solució a la columna cromatogràfica (*Mini spin column*, RNAeasy mini kit, Qiagen) i es van centrifugar a 10.000 rpm durant 15 segons. Es va descartar el líquid filtrat i es va repetir el mateix pas amb la solució restant. Seguidament, es van anar afegint diferents volums d'alcohols decreixents i es van seguir diferents passos de centrifugació per netejar la columna i deixar adherit a la membrana d'aquesta només el material genòmic. Finalment, es va eluir la mostra amb

25 microlitres d'aigua destil·lada lliure d'ARNases i es va centrifugar a 10.000 rpm durant 1 minut. Es va repetir aquest pas d'elució per obtenir 50 microlitres finals de mostra. Es van obtenir entre 5 i 10 micrograms d'ARN pur a partir d'uns 30 mil·ligrams de teixit.

4.3.1.2 Extracció d'ARN en el teixit adipós.

Per a l'extracció de l'ARN total en el teixit adipós, teixit en el que és més difícil extreure ARN per la gran quantitat de lípids que conté, es va partir d'uns 50 mg de teixit en 650 microlitres de Qiazol (*Qiazol lysis reagent*, Qiagen) el qual permet eliminar els lípids presents en gran quantitats en aquest teixit i conservar millor l'ARN present a la mostra. Es va posar la mostra congelada i els reactius en un tub d'assaig de 4 mil·lilitres de polipropilè i es va homogeneïtzar o *triturar* la mostra (*Ultra-turrax T25 basic*, IKA-Werke, GMBH&Co, Germany) durant uns 30-50 segons sense que s'escalfés (s'anava posant el tub en gel). Seguidament es va deixar reposar la mostra a temperatura ambient durant uns 5 minuts i es va transferir a un tub de recollida estèril de 1.5 mil·lilitres, es van afegir 120 microlitres de cloroform (*Chloroform for analysis*, EMD Millipore, USA), es va barrejar vigorosament i es va centrifugar a 12000 rpm durant 15 minuts a 4 °C. Es va transferir el sobrenedant incolor, que conté l'ARN dissolt, en un nou tub de recollida. Es va afegir 1 volum d'etanol absolut (*Ethanol absolute*, NormaPur, VWR Chemicals, VWR Int, S.A.S.) i es va barrejar vigorosament. Es van transferir 650 microlitres de la solució a la columna cromatogràfica (*Mini spin column*, RNeasy mini kit, Qiagen) i es va centrifugar a 10.000 rpm durant 15 segons. Es va descartar el líquid filtrat i es va repetir el mateix pas amb la solució restant. Seguidament, es van anar afegint diferents volums d'alcohols decreixents i es van seguir diferents passos de centrifugació per netejar la columna i deixar adherit a la membrana d'aquesta només el material genòmic. Finalment, es va eluir la mostra amb 25 microlitres d'aigua destil·lada lliure d'ARNases i es va centrifugar a 10.000 rpm durant 1 minut. Es va repetir aquest pas d'elució amb els mateixos 35 microlitres ja eluïts. Van obtenir entre 5 i 7 micrograms d'ARN pur a partir d'uns 50 mil·ligrams de teixit.

4.3.1.3 Quantificació d'ARN total.

En tots els casos, es va quantificar l'ARN obtingut mitjançant un mètode espectrofotomètric (*NanophotometerIMPLEN*, BioNova Científica, S.L.) que analitza l'espectre d'absorció a 260 nanòmetres (longitud d'ona per als oligonucleòtids). Per poder tenir una quantificació d'ARN acurada, però, cal comprovar la puresa de les mostres. A partir del quocient 260/280 s'analitza la puresa respecte a una possible contaminació per proteïnes, i a partir del quocient 260/230 s'analitzen altres possibles contaminacions per substàncies que

absorbeixen a 230 nanòmetres, com seria el fenol. Considerem que tenim una mostra d'ARN pura quan el quocient 260/280 es troba al voltant de 2.0 i el quocient 260/230 entre 2.0 i 2.2.

4.3.2 Retrotranscripció d'ARN a ADNc.

Les mostres d'ARN són extremadament làbils per l'acció de les ARNases presents a l'ambient, per això es va realitzar la retrotranscripció de les mostres de ARN a ADN complementari (ADNc). L'ADNc és un ADN monocatenari molt més estable sintetitzat a partir de l'ARN missatger. Utilitzant un kit comercial (*High capacity cDNA reverse transcription Kit*, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.) es van retrotranscriure fins a 2 micrograms d'ARN total a ADNc en una reacció de 20 microlitres finals que contenia: 2 microlitres de solució tamponada (*RT Buffer*), 2 microlitres de cebadors aleatoris (*Random primers*), 0.8 microlitres de nucleòtids lliures (*dNTPs*), 3.2 microlitres d'aigua destil·lada lliure d'ARNses, 1 microlitre d'inhibidor de ARNses i 1 microlitre de l'enzim retrotranscriptasa (*Multi-script reverse transcriptase*). El protocol de PCR en el termociclador va consistir en 3 etapes: 10 minuts a 25 °C (*melting* o associació de seqüències complementàries), 120 minuts a 37 °C (elongació de seqüències i degradació de ARN missatger) i 5 minuts a 85 °C (inactivació de l'enzim retrotranscriptasa termosensible), per quedar-se finalment a 4 °C.

4.3.3 Reacció en cadena de la polimerasa.

Seguidament, es va utilitzar la tècnica de reacció en cadena de la polimerasa a temps real (*real-time PCR*) per deduir els valors d'expressió dels gens estudiats a partir de l'emissió fluorescent, relativa i específica per cada cicle d'amplificació de les mostres analitzades. Es van utilitzar 45 nanograms totals de ADNc en una reacció de 25 microlitres que contenia: 1,25 microlitres d'assaigs *Taqman* (*Taqman Assays 20X* [*STK11*: Rn01535544_m1, *DLK1*: Rn00587011_m1 i *SIRT1*: Sirt1RAT-custom], Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.) i 12,5 microlitres d'una solució tamponada que contenia nucleòtids lliures i enzims ADN polimerasa (*Universal Taqman PCR Master Mix 2X*, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.). L'expressió relativa es dona com el nombre de vegades que el gen estudiat s'expressa respecte a un gen endogen (o *housekeeping*). L'expressió d'un gen endogen no es veu alterada per les condicions d'estudi, és a dir, s'expressa constitutivament, i és per aquest motiu que serveix de control. En el nostre estudi, es va escollir el gen *GAPDH* (*Taqman Assays 20X* [*GAPDH*: Rn01775763_g1], Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.) com a gen endogen pel fet d'ésser un gen consistentment expressat en la majoria dels teixits i condicions

experimentals [97]. Cada assaig *Taqman* inclou un cebador directe (o *forward primer*) i un cebador invers (o *reverse primer*), i a més a més d'una sonda (o *probe*) amb un fluorocrom adherit a un extrem i el seu inhibidor específic (o *quencher*) adherit a l'altre extrem.

El protocol de *real-time* PCR en el termociclador va consistir en 40 cicles de dues etapes: 15 s a 92 °C (desnaturalització o separació de les dues cadenes d'oligonucleòtids) i 60 s a 60 °C (elongació o amplificació de les seqüències). La tecnologia *Taqman* aprofita la capacitat exonucleasa 5'→3' de l'ADN polimerasa per degradar les sondes a mesura que avança l'extensió dels cebadors i es dupliquen les seqüències d'ADNc. Cada sonda degradada equival a un fluorocrom lliure de l'inhibidor específic que l'acompanyava. D'aquesta manera, a mesura que avancen els cicles tèrmics (*Cts*) per a l'amplificació exponencial de seqüències, augmenta el senyal fluorescent de la solució. Per cadascun dels gens estudiats i segons el nivell de fluorescència mostrat a cada cicle tèrmic al llarg dels 40 cicles d'amplificació, cada mostra origina una corba sigmoïdal que determina el nombre de cicles necessaris per arribar a un valor de fluorescència determinat (o *threshold*). Llavors, el valor *Ct* es defineix com el nombre de cicles necessaris per arribar a aquest nivell de fluorescència determinat. Aquest valor de *Ct* és inversament proporcional al nombre de còpies originals del gen en la mostra, de manera que com més còpies d'un gen hi ha a la mostra estudiada, menys cicles tèrmics es necessitaran per arribar al nivell de fluorescència determinat.

L'expressió relativa dels gens estudiats en cada mostra es va quantificar mitjançant el valor $2^{-\Delta Ct}$ que normalitza l'expressió de cada gen estudiat amb la del gen control. El valor ΔCt es calcula com la diferència entre el valor de *Ct* del gen estudiat i el valor de *Ct* del gen control per la mateixa mostra d'ADNc. Així doncs utilitzem la fórmula següent:

$$\text{Expressió relativa gen estudiat} = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct \text{ gen estudiat} - Ct \text{ gen control})}$$

4.4. Expressió gènica: proteïnes.

4.4.1. Extracció proteica.

Per observar els canvis d'expressió proteica en els diferents grups experimentals es va extreure la proteïna total dels teixits de placenta i teixit adipós. Per a l'extracció de proteïna total es van utilitzar uns 50 mg de teixit en 600 microlitres de solució de lisi 1X (*RIPA lysis buffer 10X*, Upstate Cell Signaling Solutions, USA) i un 1 % de còctel inhibidor de proteases (*PMSF Protease Inhibitor*, Upstate Cell Signaling Solutions, USA). Es va posar la mostra congelada i els reactius en un tub d'assaig de 4 mil·lilitres de polipropilè i es va homogeneïtzar

(*Ultra-turrax T25 basic*, IKA-Werke, GMBH&Co, Germany) la mostra durant uns 30-50 segons sense que s'escalfés (s'anava posant el tub en gel). Per completar la lisi cel·lular, es va mantenir la mostra uns 30 minuts en fred (sobre gel) i es va invertir cada 5 minuts. Passat aquest temps, es va centrifugar a 15.000 rpm durant 15 minuts a 4 °C per separar les proteïnes solubles de la resta. El sobrenedant obtingut contenia la mostra proteica. En el cas del teixit adipós, es va repetir aquest últim pas de centrifugació per separar bé els lípids, que queden en forma de capa lipídica solidificada a la superfície, de la fracció proteica en dissolució.

4.4.2. Quantificació de proteïna total.

La proteïna total es va quantificar amb una reacció optimitzada (més ràpida i més estable) del mètode colorimètric de *Lowry* [98] mitjançant els reactius adients (*DC protein assay*, Bio-Rad Laboratories Inc.) i interpolant directament amb una recta patró estàndard d'albumina de sèrum boví en solució aquosa. Tal com està descrit al protocol de *Lowry*, l'assaig es basa en dues reaccions colorimètriques: una primera reacció entre la proteïna en solució i la solució de tartrat de coure en medi alcalí, i una segona reacció que consisteix en la reducció del reactiu de *Folin* de la proteïna tractada amb coure. Aquesta última reacció de reducció converteix el reactiu de *Folin* en un producte amb coloració blava. Es van pipetejar 5 microlitres de la mostra proteica o estàndards en una placa transparent de 96 pouets i es van afegir 25 microlitres del tartrat de coure (*Reagent A*, DC protein assay, Bio-Rad Laboratories Inc.). Seguidament vam afegir 200 microlitres del reactiu de *Folin* (*Reagent B*, DC protein assay, Bio-Rad Laboratories Inc.) a cada pouet i es va agitar la placa uns segons. Al cap de 15 minuts en la foscor, es va fer una lectura de cada pou a una longitud d'ona de 750 nanòmetres per obtenir un valor d'absorbància que, extrapolat a la corba patró, va donar un valor de concentració.

4.4.3. Quantificació de proteïnes específiques.

La concentració relativa de les proteïnes STK11 i SIRT1 es va quantificar utilitzant kits d'*ELISA* comercials. La concentració relativa de les proteïnes STK11 i SIRT1 es va obtenir normalitzant la concentració quantificada amb l'assaig comercial amb la concentració de proteïna total quantificada per *Lowry* i també normalitzant per la quantitat de teixit inicial (en grams) en cadascuna de les mostres analitzades.

Les proteïnes STK11 i SIRT1 es van estudiar només en els teixits adipós retroperitoneal i en la placenta. La proteïna DLK1 no es va quantificar per què no hi havia fins a la data kits comercials validats per a l'espècie *Rattus norvegicus* de DLK1 circulant.

4.4.3.1. Quantificació de la proteïna STK11.

Per a la quantificació de la proteïna STK11 (*Rat Serine/threonine-protein kinase STK11 ELISA Kit*, EIAab LTD., R.O.C.) es van incubar 100 microlitres de plasma de les mostres i els determinats estàndards de la corba patró en la placa de 96 pous del kit durant 2 hores a 37 °C. Passat aquest temps, es van descartar les mostres i sense rentar els pous es van afegir 100 microlitres de l'anticòs primari als pous i es va incubar la placa durant 1 hora a 37 °C. Passat aquest temps, es van rentar els pous amb la solució de rentat a concentració 1X. Es van afegir 100 microlitres a cada pou del conjugat amb l'enzim i es va incubar la placa durant 1 hora a 37 °C. Passat aquest temps, es va repetir el mateix pas de rentat. Finalment, es va afegir el substrat enzimàtic per què reaccionés colorimètricament durant uns 20 minuts en la foscor. Es va aturar la reacció afegint la solució de parada, i es va fer una lectura de cada pou a una longitud d'ona de 450 nanòmetres per obtenir un valor d'absorbància que, extrapolat a la corba patró, va donar un valor de concentració.

4.4.3.2. Quantificació de la proteïna SIRT1.

Per a la quantificació de la proteïna SIRT1 (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Rat Sirtuin 1 (SIRT1)*, Uscn Life Science Inc., U.S.A.) es van incubar 100 microlitres de plasma de les mostres i els determinats estàndards de la corba patró en la placa de 96 pous del kit durant 2 hores a 37 °C. Passat aquest temps, es van descartar les mostres i sense rentar els pous es van afegir 100 microlitres de l'anticòs primari als pous i es va incubar la placa durant 1 hora a 37 °C. Passat aquest temps, es van rentar els pous amb la solució de rentat a concentració 1X. Es van afegir 100 microlitres a cada pou del conjugat amb l'enzim i es va incubar la placa durant 30 minuts a 37 °C. Passat aquest temps, es va repetir el mateix pas de rentat. Finalment, es va afegir el substrat enzimàtic per què reaccionés colorimètricament durant uns 15 minuts en la foscor. Es va aturar la reacció afegint la solució de parada, i es va fer una lectura de cada pou a una longitud d'ona de 450 nanòmetres per obtenir un valor d'absorbància que, extrapolat a la corba patró, va donar un valor de concentració.

4.5. Morfometria dels teixits adipós i hepàtic.

4.5.1. Talls histològics.

Per analitzar la morfometria dels teixits es van preparar seccions histològiques del teixit adipós retroperitoneal i del teixit hepàtic. Per obtenir les seccions, es van fixar i incloure els teixits de 4 rates representatives de cada grup en parafina i es va tallar el teixit en seccions de 3-4 micròmetres. Es van col·locar les mostres dins un *cassette* d'inclusió i es van deixar en formol al 10% durant 6 hores (com a mínim) per fixar-les. Seguidament es van introduir les mostres en el processador automàtic de teixits (LEICA ASP300) per substituir l'aigua tissular per la parafina, un medi líquid capaç de solidificar en les condicions de temperatura ambient. El fonament de la inclusió és que el teixit agafi una consistència homogènia i dura per poder realitzar seccions fàcilment. El processador automàtic va refixar les mostres amb formol tamponat al 10% durant 4 hores, va realitzar un rentat amb alcohol 50º i va deshidratar i endurir el teixit amb alcohols de graduacions creixents, dos estacions amb alcohol de 96º i tres estacions amb alcohol de 100º; amb xilè, durant tres estacions; i finalment amb parafina, tres estacions amb parafina en punt de fusió (per sobre els 57ºC).

Acabada la inclusió del teixit en parafina i a partir del bloc ferm confeccionat, es van obtenir seccions primes per a fer les preparacions histològiques. Les seccions de 3-4 micròmetres es van obtenir en el micròtom (Thermo Fisher Scientific Inc.) i es van posar en un bany de flotació amb aigua entre els 45-50ºC, uns quants graus per sota el punt de fusió de la parafina, per aconseguir l'estirament del teixit. Seguidament es van col·locar les seccions a sobre de laminetes portaobjectes que es van assecar a 60ºC durant 50 minuts per evitar el despreniment de la mostra. Acabat aquest procés es va procedir a la tinció de rutina per histologia de hematoxilina-eosina.

4.5.2. Tinció amb hematoxilina-eosina.

Per poder observar les seccions histològiques de manera directa amb el microscopi òptic era necessari tenyir les cèl·lules i matrius extracel·lulars amb colorants. De manera rutinària s'utilitza la tinció de hematoxilina-eosina. Es va iniciar la tinció amb un procés de desparafinació de les mostres adherides al portaobjectes, submergint les mostres en xilè durant 10 minuts, i posteriorment submergint-les en una sèrie de rentats d'igual durada amb alcohols decreixents fins arribar a aigua destil·lada. Llavors, les mostres es van submergir durant 5 minuts en hematoxilina (un colorant que s'oxida a hematina i tenyeix la cromatina del

nucli i les acumulacions de ribosomes del citoplasma, com les del reticle endoplasmàtic rugós). Passat aquest temps, es va fer un rentat de 15 minuts amb aigua corrent, es van submergir les mostres 5 minuts en aigua destil·lada i, finalment, es van tenyir durant 30 segons amb eosina al 2% (un colorant àcid que tenyirà els elements del citoplasma i la matriu extracel·lular). Passat aquest temps, es van posar les mostres en una sèrie de rentats amb alcohols creixents fins arribar a submergir-les durant 10 minuts amb xilè just abans de muntar la mostra amb medi de muntatge i cobreobjectes.

4.5.3. Obtenció d'imatges i comptatge.

Es van obtenir les imatges a través de l'observació directa a 200 augments (200X= 10x*20x) en un microscopi òptic (Olympus BX51, XC50 CellVe). Les mesures i els comptatges es van realitzar llavors amb el programa Image J (NIH, public domain). Per escalar les imatges i fer les mesures, es va obtenir també una imatge a 200 augments amb un portaobjectes micrometrat.

En el cas del teixit adipós retroperitoneal es van realitzar les mesures d'àrea (μm^2), perímetre (μm) i diàmetre (μm) dels adipòcits de 12 imatges per mostra, en un total de $n > 250$ adipòcits per grup. També es va realitzar el recompte d'adipòcits i es va calcular la densitat d'adipòcits.

En el cas del teixit hepàtic, es va mesurar l'àrea ocupada per cèl·lules parenquimàtiques a partir de l'anàlisi de la intensitat de píxels del canal d'imatge amb conversió binària i es va calcular el percentatge de parènquima hepàtic en 8 imatges per mostra, en un total de $n > 32$ camps estudiats per grup. El percentatge de parènquima hepàtic és una mesura indirecte dels lípids hepàtics que, en el cas de ser presents, no presenten tinció i resten espai al parènquima hepàtic [99].

4.6. Anàlisi estadística.

Totes les dades derivades de l'experimentació animal, és a dir, els paràmetres corporals, metabòlics i morfomètrics, es van recollir en una base de dades tipus *Acces* (Microsoft Office *Acces* 2010, Microsoft Inc.).

L'anàlisi estadística de les dades es va realitzar amb el programa SPSS versió 19.0 (SPSS software, IBM, Inc.). En primer lloc es va fer un anàlisi exploratori de les dades per identificar valors atípics, valors perduts i comprovar que totes les variables seguien una distribució normal (les quals en cas negatiu es van transformar logarítmicament amb \log_{10}). Tots els

valors s'expressen com a mitjana \pm desviació estàndard, i la significació estadística es va definir a $p < 0.05$. Per analitzar les diferències entre els dos grups de restricció fetal i comparar els diferents paràmetres estudiats es va utilitzar el test no paramètric de Mann-Whitney; per analitzar l'evolució del pes dels diferents grups de creixement postnatal i comparar la variable del pes corporal dels individus al llarg del temps es va utilitzar l'anàlisi de mesures repetides; i per les comparacions dels diferents paràmetres d'interès entre els tres grups de creixement postnatal es va realitzar un anàlisi de variància mitjançant el test ANOVA i els posteriors testos *post hoc* DMS. Les gràfiques de barres s'han realitzat llavors amb el programa Sigma Plot versió 12.0 (Systat Software Inc.). Posteriorment, es van analitzar les associacions entre paràmetres d'interès utilitzant l'anàlisi de correlacions bivariades de Spearman. Les gràfiques de dispersió s'han realitzat amb el mateix programa SPSS versió 19.0 (SPSS software, IBM, Inc.).

RESULTATS

5.1. Model de restricció fetal.

Els resultats del model de restricció fetal per als paràmetres corporals i metabòlics de les rates gestants i els paràmetres corporals de les cries en el moment del naixement per cesària es mostren a les taules 3 i 4, respectivament. Es presenten separats segons la ingesta de les rates gestants en: grup control (C) i grup restringit (R).

Les rates gestants restringides, sotmeses a una menor ingesta calòrica diària durant els 20 dies de gestació (33.88 ± 1.41 vs. 68.57 ± 5.56 kcal/dia, $p=0.005$), van presentar menor increment de pes durant la gestació, menor pes corporal al final de la gestació, menor pes total del fetge i dels ronyons, i menor acumulació de massa grassa (acumulació del teixit adipós retroperitoneal i perigonadal) comparat amb les rates control (tots entre $p=0.020$ i $p=0.006$; Taula3). A la figura 9 es pot observar l'evolució del pes corporal de les rates durant la gestació. La restricció de pes en les rates gestants restringides s'observa des del dia 7 i es fa més significativa a mesura que avança la gestació.

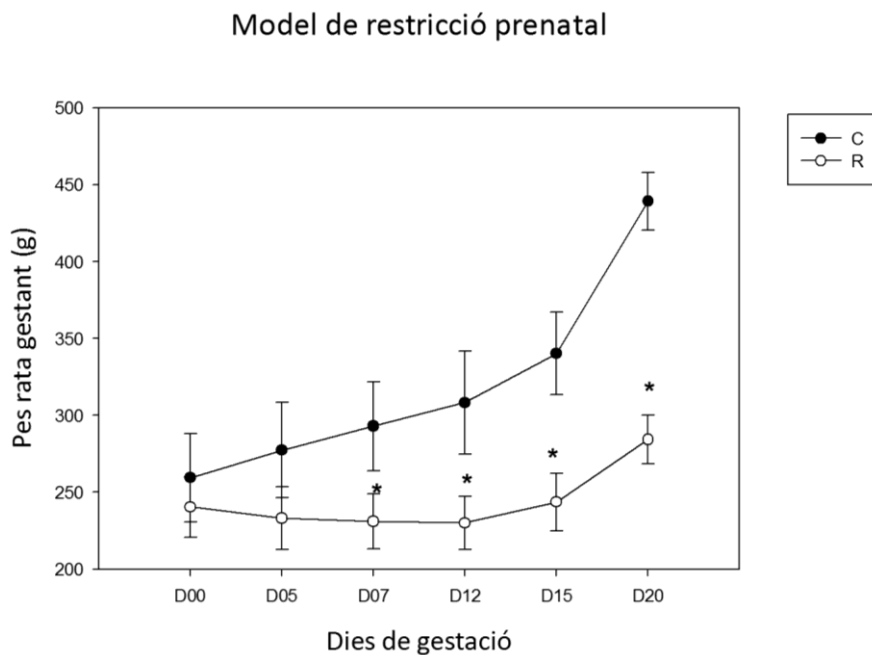


Figura 9. Pes corporal de les rates gestants en el model de restricció fetal durant la gestació. * $p<0.05$ respecte a rates control (C) (prova de Mann-Whitney).

En les rates gestants restringides s'observen també menors nivells d'adiponectina total ($p=0.025$) i de colesterol total ($p=0.034$) respecte a les rates gestants control (Taula 3).

Taula 3. Paràmetres corporals i metabòlics de les rates gestants en funció de la ingesta calòrica durant la gestació.

PERÍODE GESTACIONAL I PERINATAL	C	R	p
<i>Paràmetres corporals</i>	<i>N=5</i>	<i>N=6</i>	
Pes inicial gestació g	259.4 ± 28.8	240.5 ± 19.8	0.144
Ingesta calòrica durant gestació kcal/dia	68.57 ± 5.56	33.88 ± 1.41	0.005
Increment pes gestació g	171.3 ± 14.9	43.8 ± 10.1	0.020
Pes final gestació g	439.3 ± 18.7	284.3 ± 15.8	0.006
Pes fetge g	13.14 ± 1.14	8.16 ± 0.37	0.006
Pes ronyons g	1.68 ± 0.21	1.31 ± 0.16	0.008
Pes pàncrees g	0.55 ± 0.19	0.47 ± 0.11	0.464
Pes TA retroperitoneal g	4.16 ± 1.16	1.19 ± 0.73	0.006
Pes TA mesentèric g	1.21 ± 0.64	0.59 ± 0.27	0.100
Pes TA perigonadal g	5.85 ± 1.61	1.67 ± 0.53	0.006
Massa grassa visceral g	11.23 ± 2.24	3.46 ± 1.36	0.006
Massa grassa visceral %	2.79 ± 0.12	1.21 ± 0.43	0.020
<i>Paràmetres metabòlics</i>	<i>N=5</i>	<i>N=6</i>	
Adiponectina total mg/l	1.66 ± 90	6.96 ± 41	0.025
Glucosa mg/dl	185.0 ± 19.0	160.7 ± 48.4	0.372
Insulina ng/ml	4.75 ± 3.22	1.91 ± 0.78	0.251
HOMA-IR	12.82 ± 8.85	4.24 ± 2.33	0.289
Colesterol total mg/dl	86 ± 11	63 ± 12	0.034
Colesterol HDL mg/dl	24 ± 5	14 ± 6	0.074
Triglicèrids mg/dl	150 ± 30	151 ± 64	0.480

Els valors s'expressen com a mitjana ± desviació estàndard. L'adiponectina total es troba corregida pel pes corporal de l'animal. C: control, R: restringit, TA: teixit adipós, HOMA-IR: *homeostatic model assesment* de resistència a la insulina, HDL: *high-density lipoprotein*. Significació a $p<0.05$ (prova de Mann-Whitney).

Al moment del naixement per cesària, les cries restringides van presentar menor pes corporal, menor pes-SDS i menor pes placentari (tots entre $p=0.026$ i $p<0.0001$) respecte a les cries control (Taula 4). Concretament, les cries restringides van presentar una reducció del 14% del pes al naixement i una reducció del 25% del pes de les placentes respecte a les cries control.

Taula 4. Paràmetres corporals de les cries al naixement per cesària en funció de la ingesta calòrica de les mares durant la gestació.

PERÍODE PERINATAL	C	R	p
<i>Paràmetres corporals</i>	<i>N=20</i>	<i>N=20</i>	
Pes cries d0 g	5.14 ± 1.04	4.43 ± 0.38	0.026
Pes-SDS d0 valor-z	0.00 ± 1.00	-0.87 ± 0.37	0.026
Pes placenta g	0.76 ± 0.15	0.57 ± 0.10	<0.0001

Els valors s'expressen com a mitjana ± desviació estàndard. C: control, R: restringit, SDS: *Standard deviation score*. Significació a $p<0.05$ (prova de Mann-Whitney).

5.2. Model de creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal.

Els resultats del model de creixement recuperador postnatal per als paràmetres corporals de les rates gestants així com també els paràmetres corporals i metabòlics de les cries, tant en el moment del naixement per part natural com en el dia postnatal 42, es mostren a les taules 5 i 6, respectivament. Es troben separats segons la ingesta de les rates durant la gestació (primera lletra) i durant el període de lactància (segona lletra) en: grup control (CC), grup restringit sense creixement recuperador (RR) i grup restringit amb creixement recuperador postnatal (RC).

En primer lloc, i repetint el mètode de l'apartat anterior per assolir la restricció fetal, les rates gestants van rebre una restricció de la ingesta durant la gestació. Aquestes rates gestants restringides van presentar menor increment de pes durant la gestació i menor pes corporal al final de la gestació respecte a les rates gestants control (tots $p < 0.0001$; Taula 5); replicant així el model tal com es descriu en la primera fase (Taula 3).

En segon lloc, durant la lactància, el grup de gestants RR va rebre una ingesta calòrica significativament més baixa en comparació amb els grups RC (63.80 ± 0.01 vs. 191.57 ± 18.05 kcal/dia, $p = 0.001$) i CC (63.80 ± 0.01 vs. 179.85 ± 18.05 kcal/dia, $p = 0.002$); i van mostrar una pèrdua de pes respecte a les rates dels grups RC ($p > 0.0001$) i CC ($p = 0.001$; Taula 5). Les rates gestants del grup RC van mostrar un major increment de pes al final de la lactància en comparació amb les del grup CC ($p < 0.0001$) i les del grup RR ($p < 0.0001$; Taula 5).

Taula 5. Paràmetres corporals de les rates gestants en funció de la ingesta calòrica durant la gestació i durant la lactància.

<i>Paràmetres corporals</i>	RR	CC	RC	<i>p</i>	<i>p lineal</i>
PERÍODE DE GESTACIÓ	<i>N=2</i>	<i>N=2</i>	<i>N=2</i>		
Pes inicial gestació g	225.5 ± 2.12	263.5 ± 6.36 [#]	253.0 ± 4.24 [#]	0.008	0.009
Ingesta calòrica durant gestació kcal/dia	34.8 ± 0.01*	64.83 ± 1.36	34.80 ± 0.01*	<0.0001	0.999
Increment pes gestació g	46.5 ± 4.94*	182.2 ± 18.3	50.0 ± 12.7*	0.003	0.134
Pes final gestació g	272.0 ± 2.82*	445.5 ± 24.7	303.0 ± 8.4*	0.003	0.808
PERÍODE DE LACTÀNCIA					
Pes inicial lactància g	213.0 ± 19.8*	310.5 ± 17.6	244.5 ± 16.3*	0.009	0.083
Ingesta calòrica durant lactància kcal/dia	63.80 ± 0.01	179.85 ± 5.43 [#]	191.57 ± 18.05 [#]	0.002	0.001
Increment pes lactància g	-30.5 ± 4.9	103.5 ± 0.70 [#]	119.0 ± 4.24* [#]	<0.0001	<0.0001
Pes final lactància g	182.5 ± 4.9	414.0 ± 18.3 [#]	363.5 ± 10.6* [#]	0.001	0.001

* $p < 0.05$ respecte a CC i [#] $p < 0.05$ respecte a RR (prova post-hoc DMS).

Al moment del naixement per part natural, les cries RR i RC van presentar menor pes corporal i menor pes-SDS (tots $p < 0.0001$) respecte a les cries CC (Taula 6). Concretament, les cries RR i RC van presentar una disminució del 22% del pes al naixement respecte a les cries CC.

Taula 6. Paràmetres corporals i metabòlics de les cries en funció del creixement recuperador postnatal .

CREIXEMENT POSTNATAL	RR	CC	RC	<i>p</i>	<i>p</i> lineal
<i>Paràmetres corporals</i>	<i>N=14</i>	<i>N=14</i>	<i>N=14</i>		
Pes d1 g	5.10 ± 0.23 *	6.47 ± 0.29	5.08 ± 0.28 *	<0.0001	0.912
Pes-SDS d1 z-score	-2.72 ± 0.81 *	0.01 ± 1.01	-2.76 ± 0.98 *	<0.0001	0.912
Pes d22 g	17.81 ± 1.13	43.08 ± 3.56 #	51.32 ± 3.94* #	<0.0001	<0.0001
Pes d42 g	79.43 ± 11.64	170.62 ± 20.37 #	179.42 ± 20.43 #	<0.0001	<0.0001
Increment pes postnatal g	74.33 ± 11.69	164.15 ± 20.28 #	173.62 ± 20.66 #	<0.0001	<0.0001
Increment pes postnatal % respecte al pes	14.62 ± 2.54	25.36 ± 3.04 #	33.87 ± 4.17* #	<0.0001	<0.0001
Pes fetge g	3.59 ± 0.57	7.59 ± 1.15 #	7.82 ± 1.29 #	<0.0001	<0.0001
Pes fetge %	4.52 ± 0.30	4.44 ± 0.33	4.34 ± 0.37	0.370	0.162
Pes ronyons g	0.67 ± 0.07	1.24 ± 0.11 #	1.25 ± 0.98 #	<0.0001	<0.0001
Pes ronyons %	0.84 ± 0.08	0.73 ± 0.04 #	0.70 ± 0.04 #	<0.0001	<0.0001
Pes pàncrees g	0.28 ± 0.07	0.46 ± 0.08 #	0.42 ± 0.09 #	<0.0001	<0.0001
Pes pàncrees %	0.34 ± 0.08	0.27 ± 0.04 #	0.23 ± 0.06 #	<0.0001	<0.0001
Pes TA retroperitoneal g	0.22 ± 0.06	0.75 ± 0.26 #	1.02 ± 0.33* #	<0.0001	<0.0001
Pes TA retroperitoneal %	0.28 ± 0.08	0.43 ± 0.10 #	0.56 ± 0.13* #	<0.0001	<0.0001
Pes TA mesentèric g	0.17 ± 0.04	0.35 ± 0.07 #	0.41 ± 0.09 #	<0.0001	<0.0001
Pes TA mesentèric %	0.21 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.22 ± 0.04	0.598	0.524
Pes TA perigonadal g	0.27 ± 0.09	1.01 ± 0.32 #	1.28 ± 0.49* #	<0.0001	<0.0001
Pes TA perigonadal %	0.35 ± 0.14	0.58 ± 0.12 #	0.69 ± 0.20* #	<0.0001	<0.0001
Massa grassa visceral g	0.67 ± 0.16	2.12 ± 0.60 #	2.71 ± 0.87* #	<0.0001	<0.0001
Massa grassa visceral %	0.85 ± 0.22	1.22 ± 0.21 #	1.49 ± 0.31* #	<0.0001	<0.0001
Massa magra g	75.83 ± 10.88	158.87 ± 18.65 #	164.70 ± 20.10 #	<0.0001	<0.0001
<i>Paràmetres metabòlics</i>	<i>N=14</i>	<i>N=14</i>	<i>N=14</i>		
Adiponectina total mg/l	19.81 ± 9.33	12.41 ± 4.71 #	10.42 ± 5.65 #	0.002	0.001
Glucosa mg/dl	147 ± 13	177 ± 18 #	161 ± 10* #	<0.0001	0.017
Insulina ng/ml	0.90 ± 0.39	1.55 ± 0.14 #	1.90 ± 0.74 #	<0.0001	<0.0001
HOMA-IR	1.62 ± 0.77	3.53 ± 0.67 #	3.97 ± 1.34 #	<0.0001	<0.0001
Colesterol total mg/dl	95 ± 13	86 ± 9	93 ± 9	0.241	0.329
Colesterol HDL mg/dl	35 ± 7	30 ± 4	34 ± 6	0.160	0.783
Triglicèrids mg/dl	74 ± 24	121 ± 39 #	126 ± 53 #	0.003	0.002

Els valors s'expressen com a mitjana ± desviació estàndard. L'adiponectina total es troba corregida pel pes corporal de l'animal. RC: creixement recuperador postnatal, CC: control, RR: restringit, SDS: *Standard deviation score*, TA: teixit adipós, HOMA-IR: *homeostatic model assesment* de resistència a la insulina, HDL: *high-density lipoprotein*. * $p < 0.05$ respecte a CC i # $p < 0.05$ respecte a RR (prova post-hoc DMS).

Al final del període de lactància, en el dia postnatal 22, les cries RC van mostrar un major pes corporal respecte a les cries CC ($p < 0.0001$) i les cries RR ($p < 0.0001$; Taula 6 i Figura 10).

Al final del període de creixement postnatal, en el dia postnatal 42, les cries RC van mostrar un major increment de pes, pes dels teixits adipós retroperitoneal i perigonadal, i massa grassa visceral que els grups CC i RR (tots entre $p=0.042$ i $p<0.0001$; Taula 6). Respecte als òrgans dissecats, el pes del pàncrees i dels ronyons va ser menor en els grups CC (tots $p<0.0001$) i RC (tots $p<0.0001$) respecte al grup RR (Taula 6). I finalment cal destacar que no es van observar diferències significatives entre grups pel que fa al fetge i al teixit adipós mesentèric tenint en compte el percentatge entre el pes de l'òrgan respecte al pes corporal de l'animal (Taula 6).

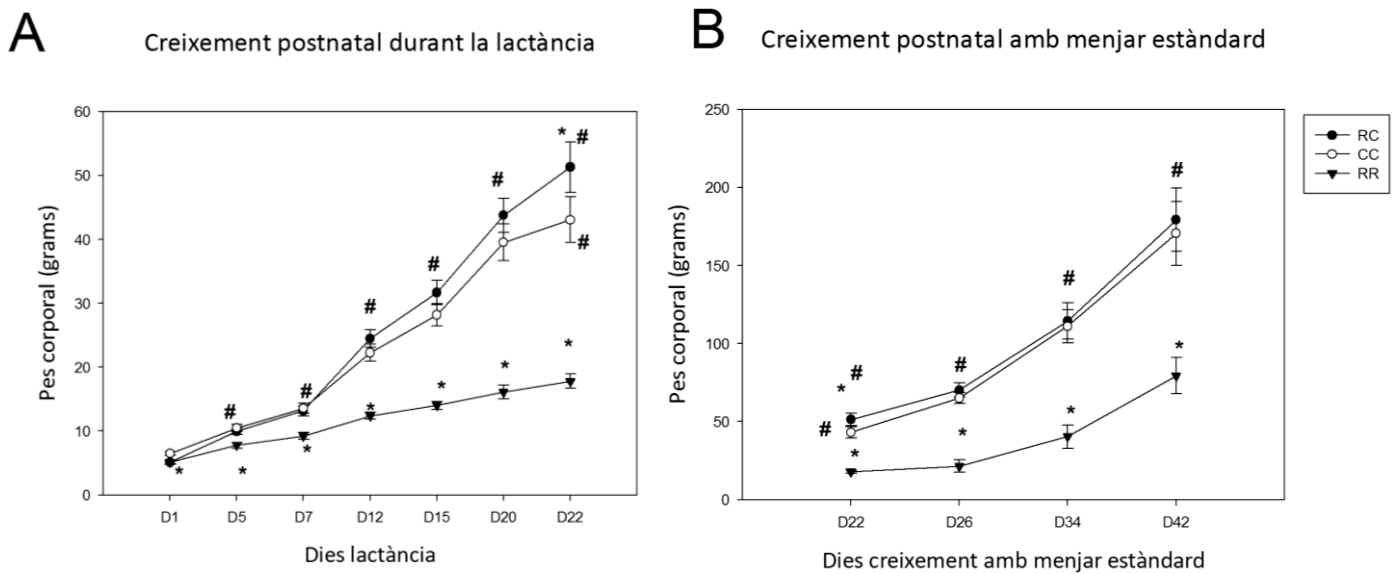


Figura 10. Pes corporal de les cries en el model de creixement recuperador postnatal durant els períodes de lactància i creixement. **A)** Creixement postnatal durant la lactància i **B)** creixement postnatal fins el dia postnatal 42. * $p<0.05$ respecte a CC i # $p<0.05$ respecte a RR (prova post-hoc DMS).

Pel que fa als paràmetres metabòlics al dia postnatal 42, s'observa una menor quantitat d'adiponectina total en les cries RC i les cries CC respecte a les cries RR ($p=0.001$ i $p=0.007$, respectivament; Taula 6 i Figura 11). Els nivells de glucosa disminueixen en els grups RC i RR respecte al grup CC ($p=0.006$ i $p<0.0001$, respectivament; Taula 6). Els nivells d'insulina, al contrari, augmenten en el grup RC respecte al grup RR ($p<0.0001$) i el valor de l'índex de resistència a la insulina HOMA-IR és significativament més elevat en aquest grup RC respecte al grup RR ($p<0.0001$; Taula 6 i Figura 11). Finalment, s'observa com els grups RC i CC presenten nivells més alts de triglicèrids en sang que el grup RR ($p=0.002$ i $p=0.004$, respectivament; Taula 6 i Figura 11).

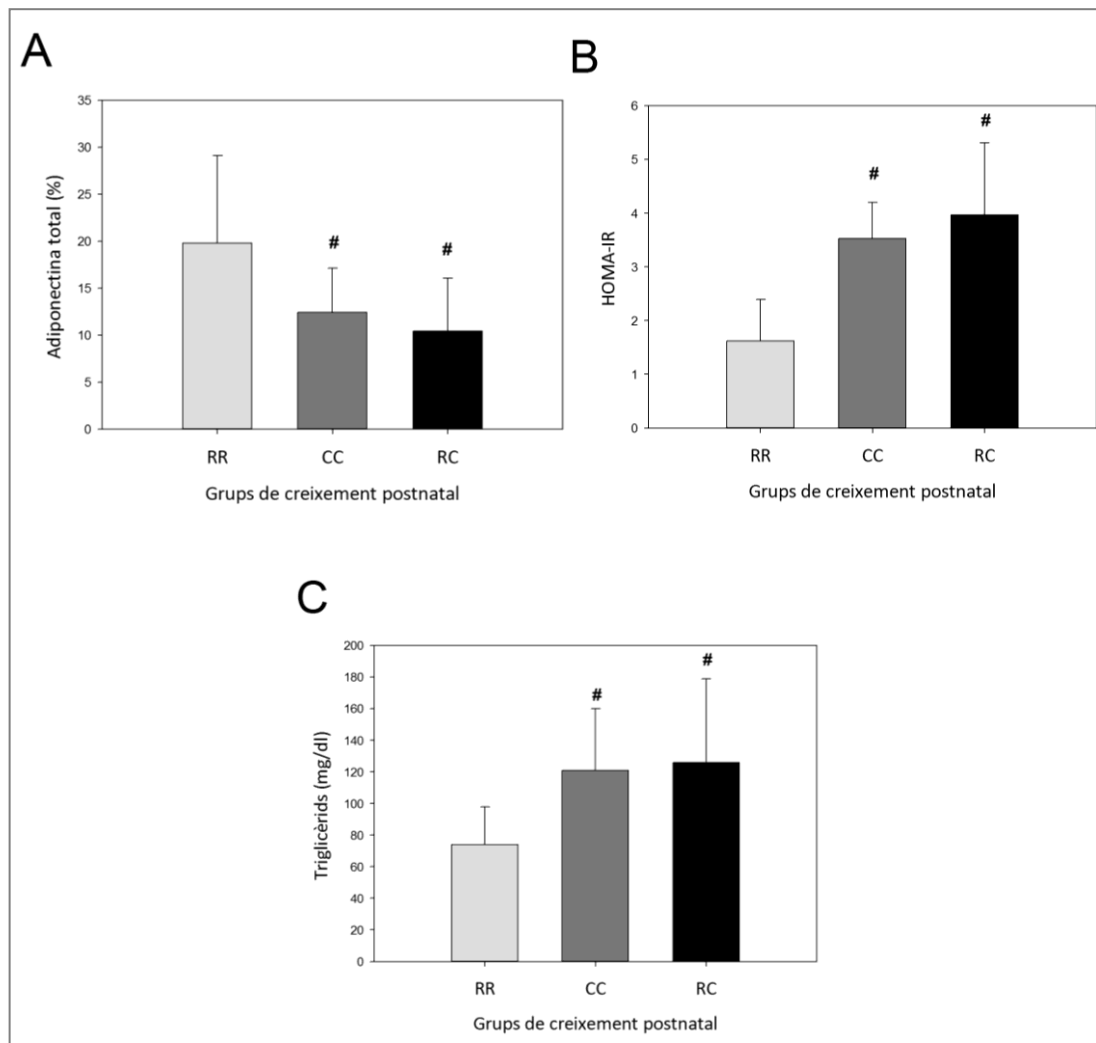


Figura 11. Paràmetres metabòlics de les cries en el model de creixement recuperador postnatal. **A)** Nivells d'adiponectina total, **B)** índex de resistència a la insulina HOMA-IR i **C)** nivells de triglicèrids en plasma. [#] $p < 0.05$ respecte a RR (prova post-hoc DMS).

No es van observar diferències evidents entre gèneres i per tant es mostren les dades combinades de mascles i femelles.

5.3. Efecte del creixement recuperador postnatal en el metabolisme energètic mitjançant l'estudi de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal de les cries.

Els resultats per als paràmetres d'expressió gènica i morfometria en el teixit adipós retroperitoneal de les cries en el model de creixement recuperador postnatal a dia postnatal

42 es mostren a les taules 7 i 8, respectivament, i es presenten separats segons els grups RR, CC i RC.

5.3.1. Comparació entre grups.

L'expressió relativa dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal es troba disminuïda en les cries RC i CC respecte a les cries restringides (tots $p < 0.002$; Taula 7 i Figura 12). De la mateixa manera, la concentració relativa de les proteïnes *STK11* i *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal també es troba disminuïda en els grups RC i CC (totes $p < 0.001$) respecte al grup RR (Taula 7 i Figura 13).

Taula 7. Variables d'expressió gènica i morfomètriques en el teixit adipós retroperitoneal.

TEIXIT ADIPÓS RETROPERITONEAL	RR	CC	RC	<i>p</i>	<i>p</i> lineal
<i>Expressió gènica</i>	<i>N=14</i>	<i>N=14</i>	<i>N=14</i>		
Expressió relativa <i>STK11</i> 2-ACt	0.3816 ± 0.2384	0.0713 ± 0.0403 [#]	0.0542 ± 0.0313 [#]	<0.0001	<0.0001
Expressió relativa <i>DLK1</i> 2-ACt	0.0093 ± 0.0093	0.0002 ± 0.0002 [#]	0.0001 ± 0.0001 [#]	<0.0001	<0.0001
Expressió relativa <i>SIRT1</i> 2-ACt	0.0594 ± 0.0562	0.0163 ± 0.0150 [#]	0.0083 ± 0.0051 [#]	0.001	<0.0001
Proteïna <i>STK11</i> ng/g	65.11 ± 35.81	29.41 ± 24.90 [#]	13.54 ± 11.09 ^{* #}	<0.0001	<0.0001
Proteïna <i>SIRT1</i> ng/g	379.55 ± 153.28	157.98 ± 98.93 [#]	84.96 ± 58.55 ^{* #}	<0.0001	<0.0001
<i>Morfometria</i>	<i>N=4</i>	<i>N=4</i>	<i>N=4</i>		
Àrea adipòcits μm^2	2144 ± 533	3277 ± 900 [#]	4933 ± 1336 ^{* #}	<0.0001	<0.0001
Perímetre adipòcits μm	170.1 ± 21.5	209.4 ± 29.2 [#]	257.8 ± 33.7 ^{* #}	<0.0001	<0.0001
Diàmetre adipòcits μm	49.4 ± 7.4	62.2 ± 10.4 [#]	75.4 ± 10.8 ^{* #}	<0.0001	<0.0001
Densitat adipòcits $\text{n}^\circ\text{cèl}/\text{mm}^2$	531 ± 153	340 ± 83 [#]	242 ± 85 ^{* #}	<0.0001	<0.0001

Els valors s'expressen com a mitjana ± desviació estàndard. Totes les expressions relatives i nivells de proteïna estan corregides per al pes del teixit adipós retroperitoneal de l'animal. RC: creixement recuperador postnatal, CC: control, RR: creixement restringit. Les variables de concentració de proteïna han estat transformades logarítmicament (log10). * $p < 0.05$ respecte a CC i[#] $p < 0.05$ respecte a RR (prova post-hoc DMS).

Les cries RC van presentar major àrea, perímetre i diàmetre dels adipòcits en el teixit adipós retroperitoneal respecte a les cries CC i RR (tots $p < 0.0001$; Taula 7). Com era d'esperar, aquestes mateixes cries RC van mostrar una densitat d'adipòcits menor en el teixit adipós retroperitoneal respecte als altres grups (tots $p < 0.0001$; Taula 7). En la figura 12 es mostren unes imatges representatives del teixit adipós retroperitoneal (Figura 14A) i es representa l'àrea dels adipòcits (Figura 14B) en els tres grups.

Expressió gènica en el teixit adipós retroperitoneal

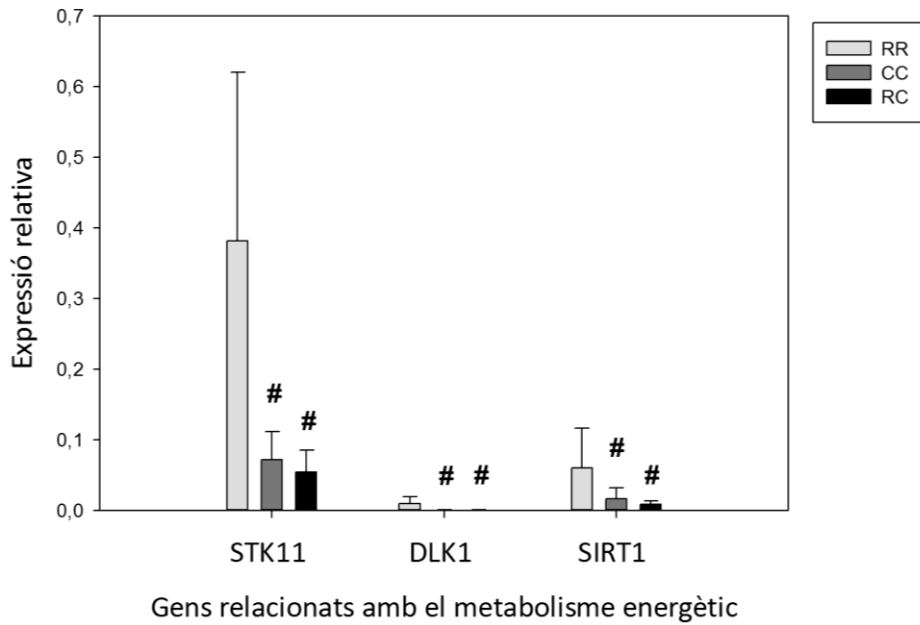


Figura 12. Expressió de *STK11*, *DLK1*, *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal per grups de creixement postnatal. # $p < 0.05$ respecte a RR (prova post-hoc DMS).

Concentració de proteïnes en el teixit adipós retroperitoneal

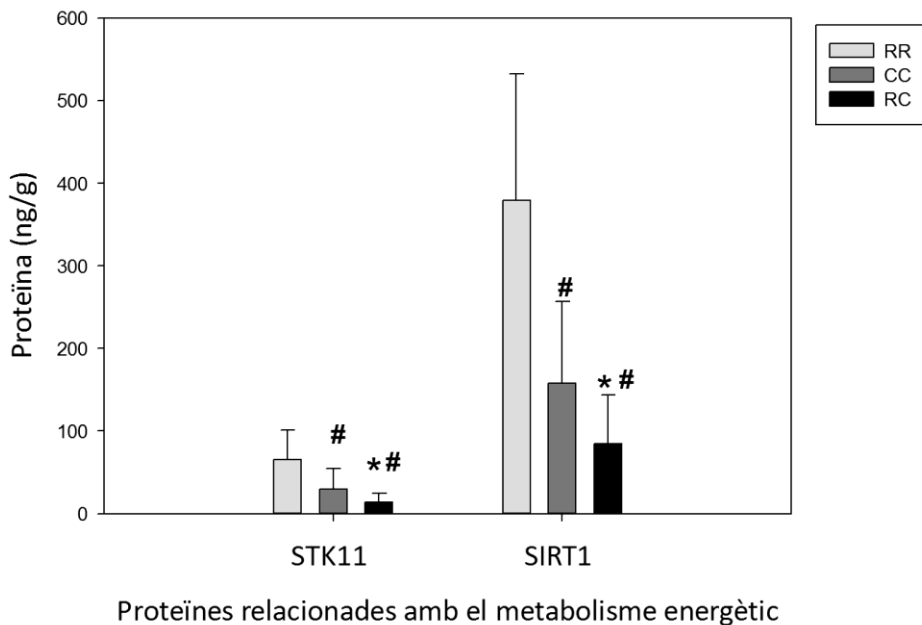


Figura 13. Concentració de les proteïnes *STK11* i *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal per grups de creixement postnatal. * $p < 0.05$ respecte a CC i # $p < 0.05$ respecte a RR (prova post-hoc DMS).

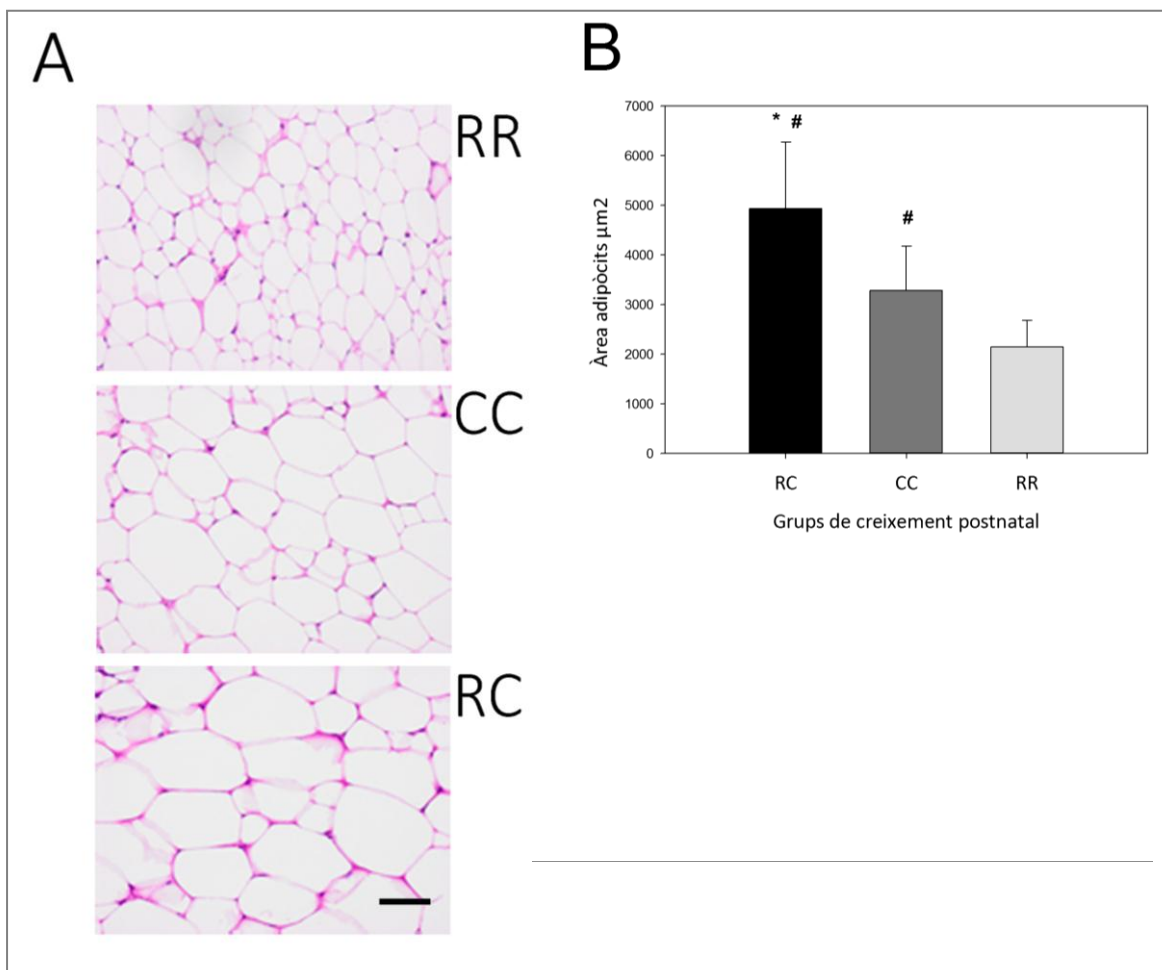


Figura 14. Morfometria del teixit adipós en els grups de creixement recuperador postnatal. **A.** Imatges representatives del teixit adipós retroperitoneal a dia postnatal 42. Barra d'escala: 50 μm . **B.** Gràfic de barres de l'àrea dels adipòcits en els diferents grups. La mida dels adipòcits es va mesurar utilitzant imatges del teixit adipós retroperitoneal ($n > 250$ cèl·lules per grup). * $p < 0.05$ respecte a CC i # $p < 0.05$ respecte a RR (prova post-hoc DMS).

5.3.2. Associació entre variables.

A continuació s'ha estudiat l'associació de l'expressió dels gens *STK11*, *DKL1* i *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal amb els paràmetres corporals i metabòlics de les cries (Taula 8).

L'expressió del gen *STK11* en el teixit adipós retroperitoneal s'associa negativament amb el pes corporal, l'increment de pes postnatal i la massa grassa visceral (tots entre $r = -0.714$ i $r = -0.901$, $p = 0.004$ i $p < 0.0001$) en les cries RC i CC (Taula 8 i Figura 15). A més, les cries CC presenten una associació negativa entre l'expressió de *STK11* en el teixit adipós retroperitoneal i els nivells de glucosa ($r = -0.596$, $p = 0.025$) i triglicèrids en plasma ($r = -0.706$, $p = 0.005$; Taula 8 i Figura 16). I finalment en les cries RR s'associa negativament amb la massa

grassa visceral ($r=-0.648$, $p=0.012$, Figura 15) i amb els nivells de glucosa en plasma ($r=-0.535$, $p=0.049$; Taula 8 i Figura 16).

Taula 8. Correlacions de les variables en relació a l'expressió gènica dels gens d'estudi en el teixit adipós retroperitoneal.

TEIXIT ADIPÓS RETROPERITONEAL	RR		CC		RC	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Expressió relativa <i>STK11</i>						
Pes d42 g	-0.314	0.274	-0.714	0.004	-0.901	<0.0001
Increment pes postnatal g	-0.314	0.274	-0.714	0.004	-0.879	<0.0001
Massa grassa visceral g	-0.636	0.015	-0.767	0.001	-0.890	<0.0001
Massa grassa visceral %	-0.648	0.012	-0.798	0.001	-0.868	<0.0001
Glucosa mg/dl	-0.535	0.049	-0.596	0.025	-0.402	0.174
Triglicèrids mg/dl	-0.242	0.404	-0.706	0.005	-0.462	0.112
Expressió relativa <i>DLK1</i>						
Pes d42 g	0.081	0.782	-0.429	0.126	-0.895	<0.0001
Increment pes postnatal g	0.081	0.782	-0.407	0.149	-0.873	<0.0001
Massa grassa visceral g	-0.297	0.303	-0.499	0.069	-0.820	<0.0001
Massa grassa visceral %	-0.354	0.215	-0.613	0.020	-0.789	0.001
Adiponectina total mg/l	-0.609	0.021	0.160	0.584	0.544	0.055
Glucosa mg/dl	0.084	0.776	-0.380	0.180	-0.542	0.045
Expressió relativa <i>SIRT1</i>						
Massa grassa visceral %	-0.582	0.029	-0.543	0.045	-0.042	0.887

Els valors s'expressen com a *r* de Spearman. Totes les expressions relatives estan corregides per al pes del teixit adipós retroperitoneal de l'animal. Les variables d'expressió relativa han estat transformades logàritmicament (\log_{10}). RC: creixement recuperador postnatal, CC: control, RR: restringit. Significació a $p<0.05$ (correlació bivariada de Spearman).

L'expressió del gen *DLK1* en el teixit adipós retroperitoneal s'associa negativament amb el pes corporal, l'increment de pes postnatal i la massa grassa visceral (tots entre $r=-0.789$ i $r=-0.895$, $p=0.001$ i $p<0.0001$, Figura 15) i també amb els nivells de glucosa en plasma ($r=-0.542$, $p=0.045$, Figura 16) en les cries RC (Taula 8). Aquesta expressió gènica de *DLK1* també s'associa negativament amb la massa visceral ($r=-0.613$, $p=0.020$, Figura 15) en les cries CC i amb els nivells d'adiponectina total en plasma ($r=-0.609$, $p=0.021$) en les cries RR (Taula 8).

L'expressió del gen *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal s'associa de manera negativa amb la massa grassa visceral tant en les cries CC ($r=-0.543$, $p=0.045$) com en les cries RR ($r=-0.582$, $p=0.029$; Taula 8).

No s'observa cap associació de les proteïnes *STK11* i *SIRT1* amb les variables corporals o metabòliques (Taula 8).

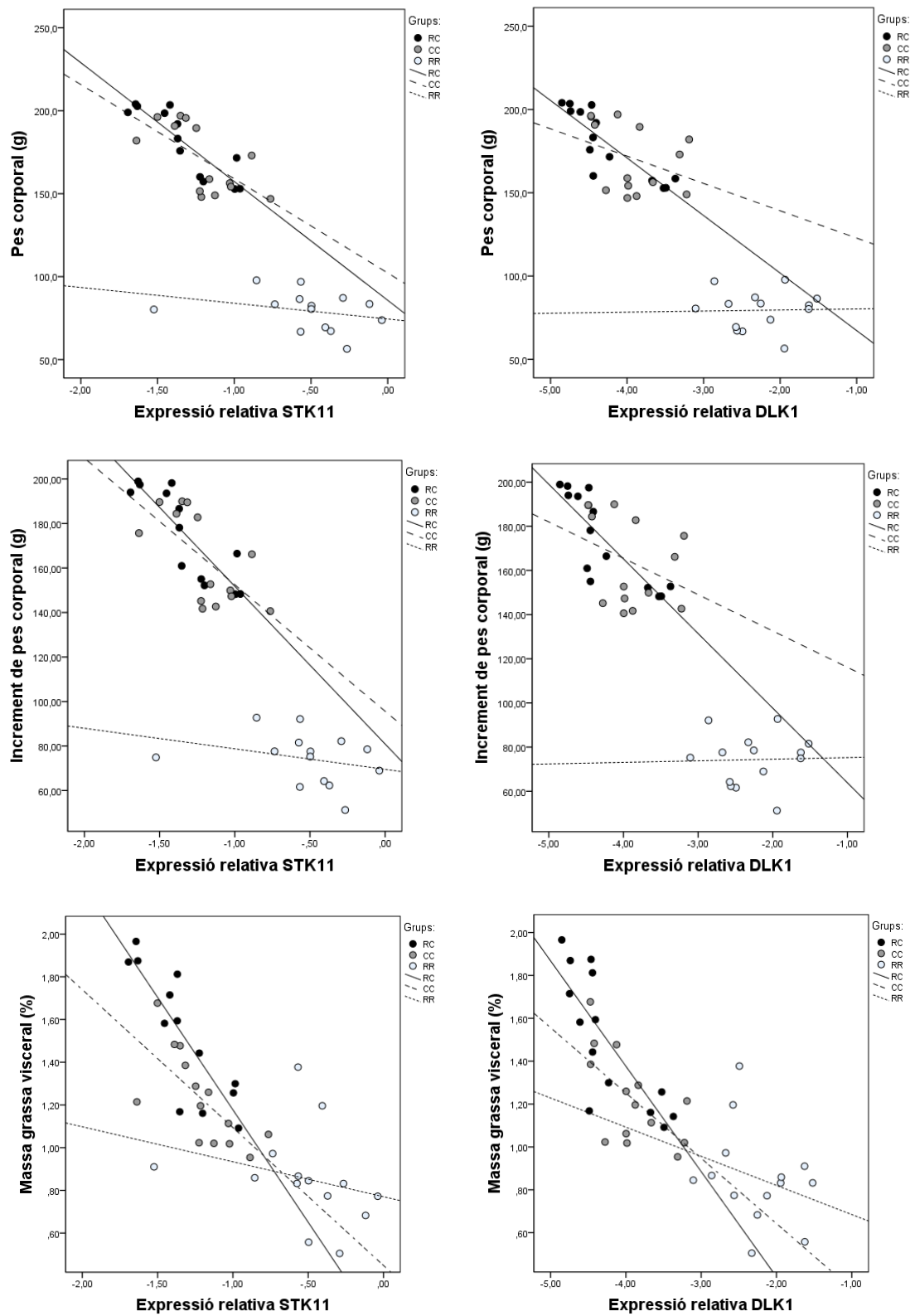


Figura 15. Correlacions entre l'expressió gènica de *STK11* i *DLK1* en el teixit adipós retroperitoneal amb els paràmetres corporals d'estudi (pes corporal a d42, increment de pes postnatal i massa grassa visceral) en els diferents grups de creixement postnatal.

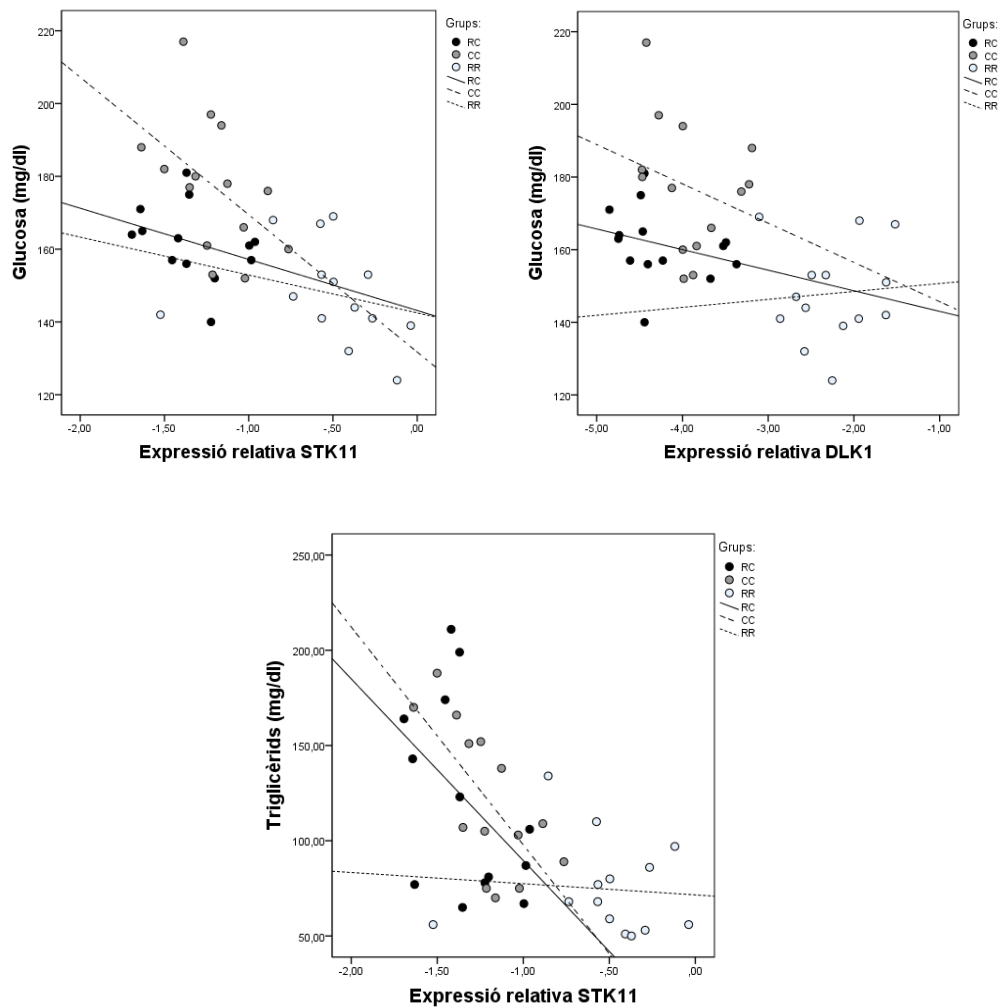


Figura 16. Correlacions entre l'expressió gènica de *STK11* i *DLK1* en el teixit adipós retroperitoneal amb els paràmetres metabòlics d'estudi (glucosa i triglicèrids) en els diferents grups de creixement postnatal.

5.4. Efecte del creixement recuperador postnatal en el metabolisme energètic mitjançant l'estudi de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit hepàtic de les cries.

Els resultats per als paràmetres d'expressió gènica i morfometria en el teixit hepàtic de les cries en el model de creixement recuperador postnatal a dia postnatal 42 es mostren a les taules 9 i 10, respectivament, i es presenten separats segons els grups RR, CC i RC.

5.4.1. Comparació entre grups.

L'expressió relativa del gen *STK11* en el teixit hepàtic és menor en els grups RC ($p < 0.0001$) i CC ($p < 0.0001$) respecte a les cries RR (Taula 9 i Figura 17). L'expressió relativa del gen *SIRT1* en el teixit hepàtic és menor en el grup RC respecte al grup RR ($p = 0.049$; Taula 9 i Figura 17). Cal esmentar que l'expressió relativa del gen *DLK1* en el teixit hepàtic va ser pràcticament indetectable i per aquest motiu no es mostra en els resultats.

Taula 9. Variables d'expressió gènica i morfomètriques en el teixit hepàtic.

TEIXIT HEPÀTIC	RR	CC	RC	<i>p</i>	<i>p</i> lineal
<i>Expressió gènica</i>	<i>N=14</i>	<i>N=14</i>	<i>N=14</i>		
Expressió relativa <i>STK11</i> 2-<i>ACT</i>	0.0117 ± 0.0037	0.0035 ± 0.0016 #	0.0041 ± 0.0021 #	0.003	0.001
Expressió relativa <i>SIRT1</i> 2-<i>ACT</i>	0.0028 ± 0.0018	0.0022 ± 0.0017	0.0016 ± 0.0009 #	0.141	0.049
<i>Morfometria</i>	<i>N=4</i>	<i>N=4</i>	<i>N=4</i>		
Àrea parenquimàtica %	60.1 ± 5.1	56.9 ± 2.1 #	58.1 ± 4.8 #	0.010	0.019

Els valors s'expressen com a mitjana ± desviació estàndard. Totes les expressions relatives estan corregides pel pes del teixit hepàtic de l'animal. RC: creixement recuperador postnatal, CC: control, RR: creixement restringit. * $p < 0.05$ respecte a CC i # $p < 0.05$ respecte a RR (prova post-hoc DMS).

Expressió gènica en el teixit hepàtic

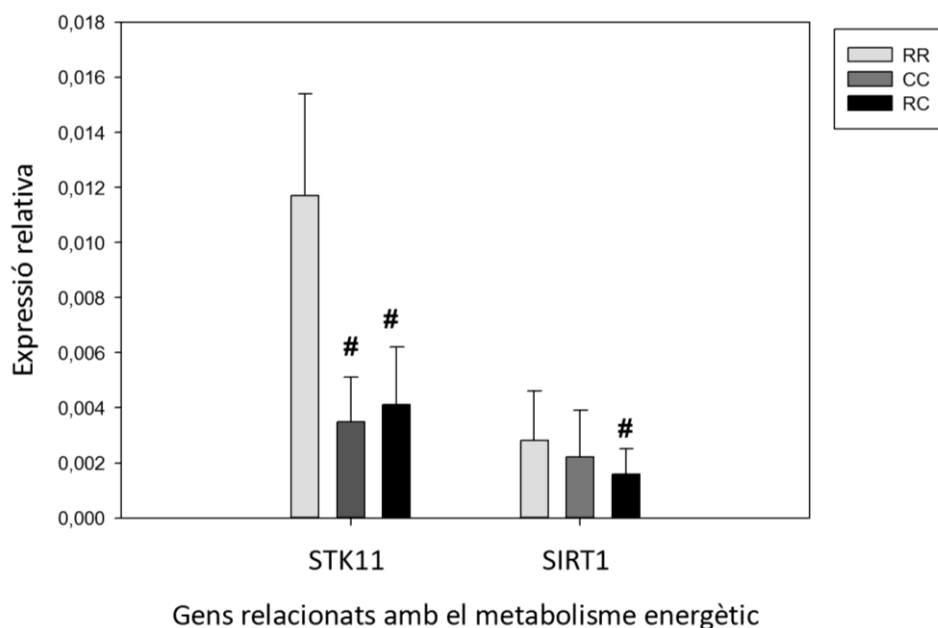


Figura 17. Expressió de *STK11* i *SIRT1* en el teixit hepàtic per grups de creixement postnatal. # $p < 0.05$ respecte a RR (prova post-hoc DMS).

Les cries RR van presentar major àrea parenquimàtica en el teixit hepàtic respecte a les cries CC i RC (tots $p < 0.010$; Taula 9). En la Figura 18 es mostren unes imatges representatives del teixit hepàtic (18A) i es representa el percentatge d'àrea parenquimàtica (18B) en els tres grups.

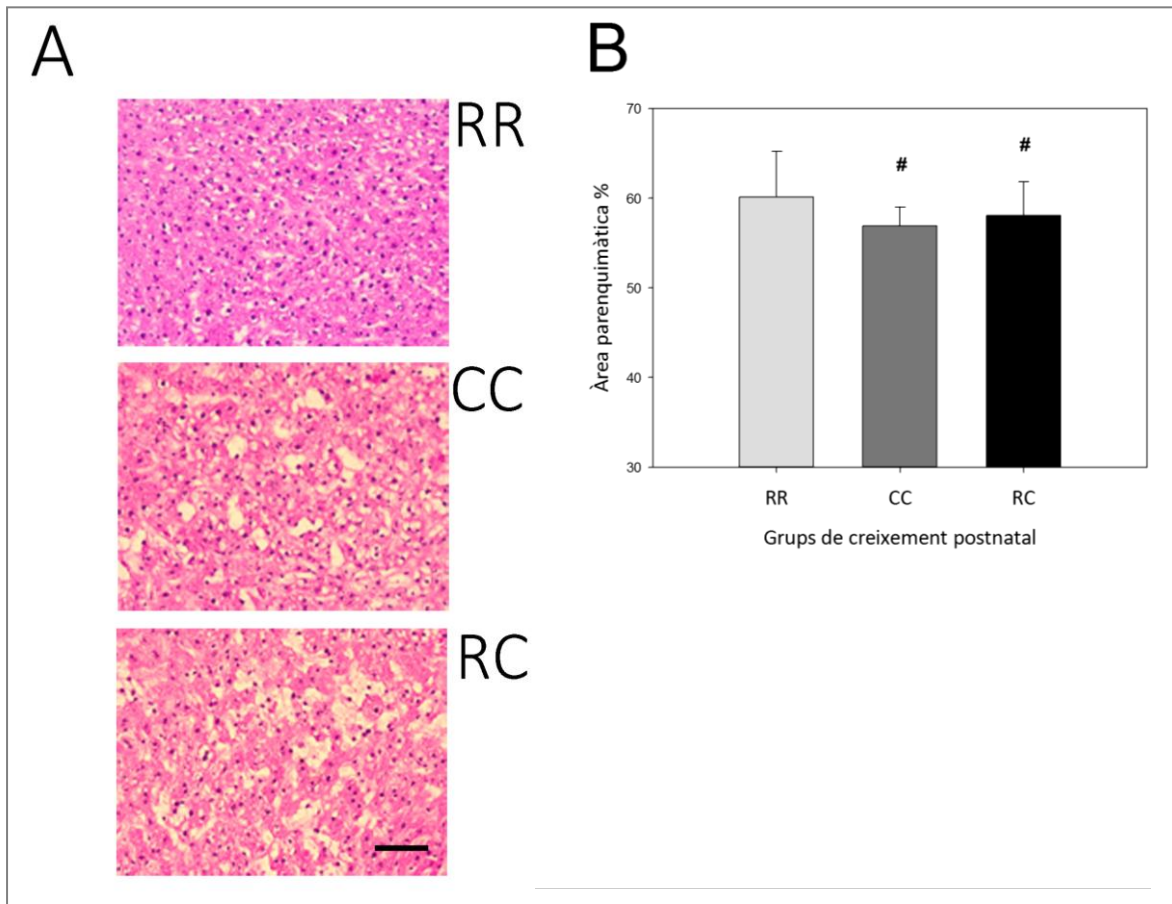


Figura 18. Morfometria del teixit hepàtic en els grups de creixement recuperador postnatal. **A.** Imatges representatives del teixit hepàtic a dia postnatal 42. Barra d'escala: 50 μ m. **B.** Gràfic de barres de l'àrea parenquimàtica en els diferents grups. L'àrea parenquimàtica es va mesurar utilitzant imatges del teixit hepàtic (n > 30 camps per grup). [#] p<0.05 respecte a RR (prova post-hoc DMS).

5.4.2. Associació entre variables

L'expressió del gen *STK11* en el teixit hepàtic en les cries RC i RR s'associa negativament amb el pes corporal ($r=-0.534$, $p=0.049$ i $r=-0.599$, $p=0.031$, respectivament; Taula 10 i Figura 19) i positivament amb el colesterol total ($r=0.645$, $p=0.013$ i $r=0.714$, $p=0.006$, respectivament; Taula 10 i Figura 20). En les cries RC aquesta expressió del gen *STK11* també s'associa positivament amb el colesterol HDL ($r=0.544$, $p=0.044$; Taula 10). D'altra banda, el grup CC no presenta cap associació entre l'expressió del gen *STK11* en el teixit hepàtic i les variables corporals o metabòliques.

L'expressió del gen *SIRT1* en el teixit hepàtic s'associa positivament amb el pes corporal, l'increment de pes postnatal i la massa grassa visceral (tots entre $r=0.547$ i $r=0.679$, $p=0.043$ i $p=0.008$) en les cries RC (Taula 10 i Figura 19). En les cries CC també s'associa positivament amb el pes corporal ($r=0.648$, $p=0.012$) i l'increment de pes postnatal ($r=0.648$, $p=0.012$), així com també amb els nivells de triglicèrids ($r=0.660$, $p=0.010$; Taula 10 i Figura 19 i 20). I finalment, en

el grup de cries RR l'expressió de *SIRT1* en el teixit hepàtic s'associa negativament amb els nivells d'insulina en sang ($r=-0.624$, $p=0.023$) i amb l'índex HOMA-IR ($r=-0.659$, $p=0.014$; Taula 10 i Figura 20).

Taula 10. Correlacions de les variables en relació a l'expressió gènica dels gens d'estudi en el teixit hepàtic.

TEIXIT HEPÀTIC	RR		CC		RC	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Expressió relativa <i>STK11</i>						
Pes d42 g	-0.599	0.031	0.037	0.899	-0.534	0.049
Colesterol total mg/dl	0.714	0.006	-0.015	0.958	0.645	0.013
Colesterol HDL mg/dl	0.541	0.056	-0.239	0.410	0.544	0.044
Expressió relativa <i>SIRT1</i>						
Pes d42 g	0.335	0.263	0.648	0.012	0.560	0.037
Increment pes postnatal g	0.335	0.263	0.648	0.012	0.547	0.043
Massa grassa visceral g	-0.104	0.734	0.490	0.075	0.679	0.008
Massa grassa visceral %	-0.132	0.668	0.275	0.342	0.679	0.008
Insulina ng/ml	-0.624	0.023	-0.319	0.267	0.143	0.626
HOMA-IR	-0.659	0.014	-0.169	0.563	0.059	0.840
Triglicèrids mg/dl	0.058	0.851	0.660	0.010	0.037	0.899

Els valors s'expressen com a *r* de Spearman. Totes les expressions relatives estan corregides pel pes del teixit hepàtic de l'animal. La variable d'expressió relativa *STK11* ha estat transformada logarítmicament (\log_{10}). RC: creixement recuperador postnatal, CC: control, RR: restringit, HDL: *high-density lipoprotein*. Significació a $p < 0.05$ (correlació bivariada de Spearman).

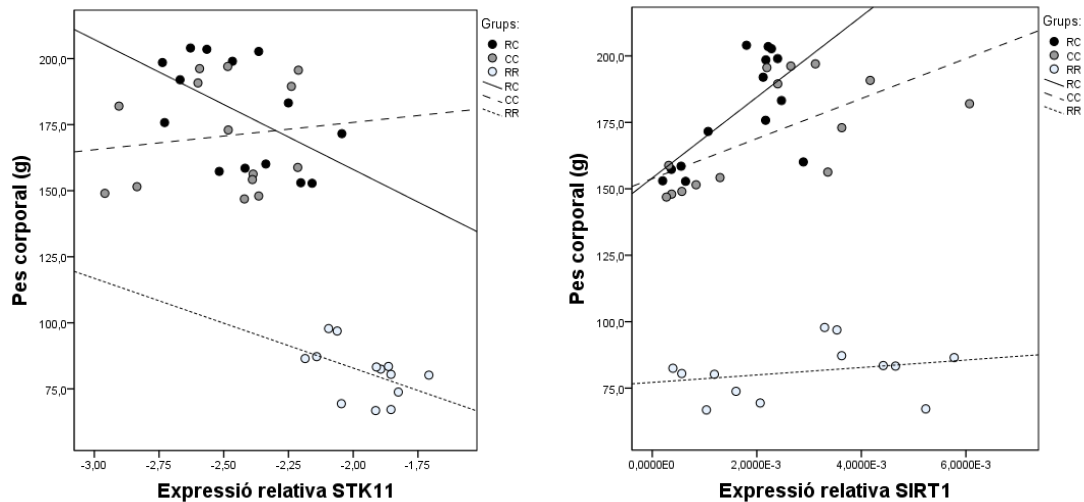


Figura 19. Correlacions entre l'expressió gènica de *STK11* i *SIRT1* en el teixit hepàtic amb els paràmetres corporals d'estudi (pes corporal a d42) en els diferents grups de creixement postnatal.

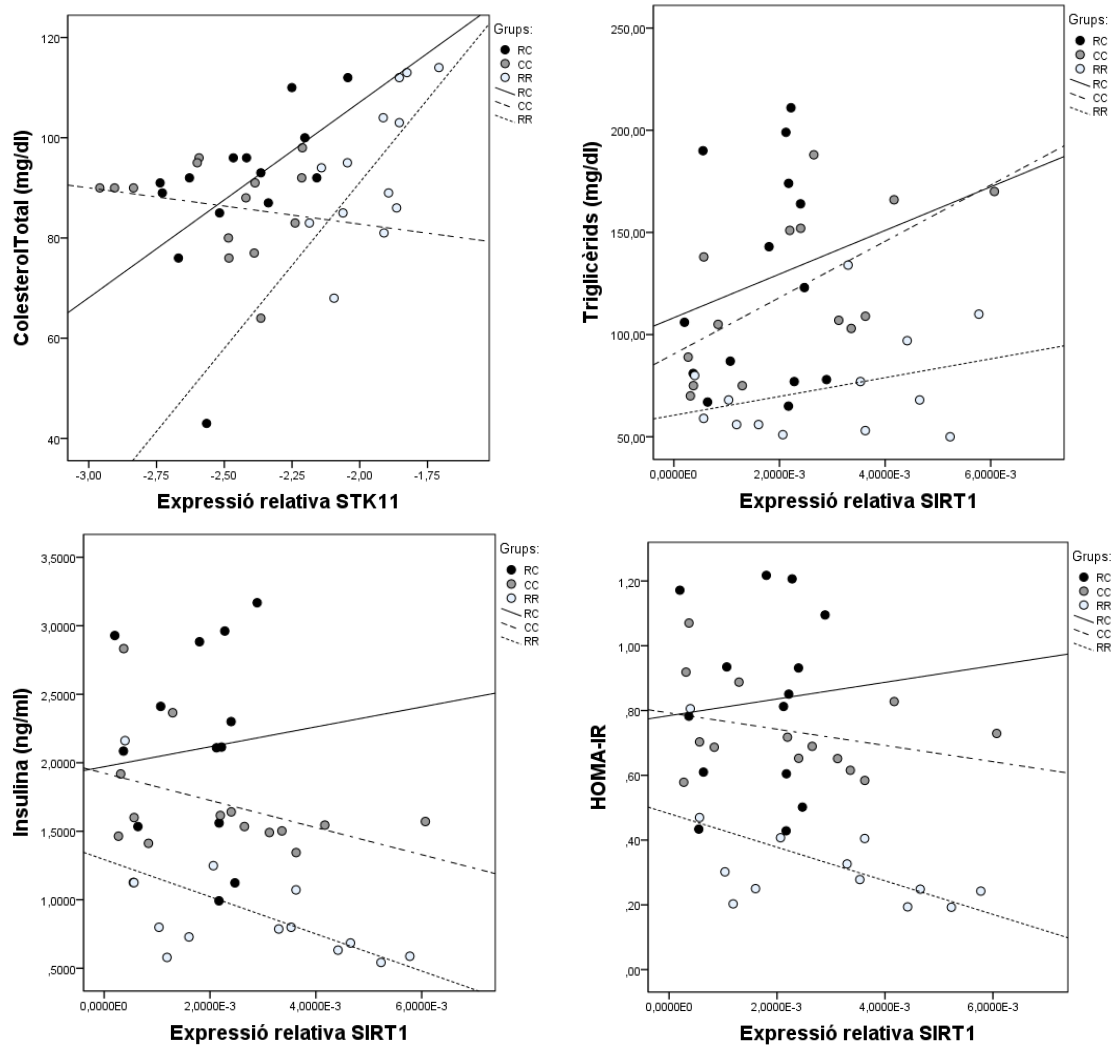


Figura 20. Correlacions entre l'expressió gènica de *STK11* i *SIRT1* en el teixit hepàtic amb els paràmetres metabòlics d'estudi (colesterol total, triglicèrids, insulina i HOMA-IR) en els diferents grups de creixement postnatal.

5.5. Efecte del creixement recuperador postnatal en el metabolisme energètic mitjançant l'estudi de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit muscular de les cries.

Els resultats per als paràmetres d'expressió gènica en el teixit muscular de les cries en el model de creixement recuperador postnatal a dia postnatal 42 es mostren a les taules 11 i 12, respectivament, i es presenten separats segons els grups RR, CC i RC.

5.5.1. Comparació entre grups

L'expressió relativa dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit muscular és menor en les mostres de les cries RC i CC en comparació amb les cries RR (tots entre $p=0.014$ i $p<0.0001$; Taula 11 i Figura 21).

Taula 11. Variables d'expressió gènica en el teixit muscular.

TEIXIT MUSCULAR	RR	CC	RC	<i>p</i>	<i>p</i> lineal
<i>Expressió gènica</i>	<i>N=14</i>	<i>N=14</i>	<i>N=14</i>		
Expressió relativa <i>STK11 2-Act</i>	0.0178 ± 0.0072	0.0100 ± 0.0076 [#]	0.0085 ± 0.0069 [#]	0.012	0.005
Expressió relativa <i>DLK1 2-Act</i>	0.0187 ± 0.0155	0.0039 ± 0.0024 [#]	0.0030 ± 0.0028 [#]	<0.0001	<0.0001
Expressió relativa <i>SIRT1 2-Act</i>	0.0025 ± 0.0014	0.0004 ± 0.0003 [#]	0.0006 ± 0.0004 [#]	<0.0001	<0.0001

Els valors s'expressen com a mitjana ± desviació estàndard. Totes les expressions relatives estan estandarditzades pel pes de la massa magra de l'animal. RC: creixement recuperador postnatal, CC: control, RR: creixement restringit.
[#] $p<0.05$ respecte a RR (prova post-hoc DMS).

Expressió gènica en el teixit muscular

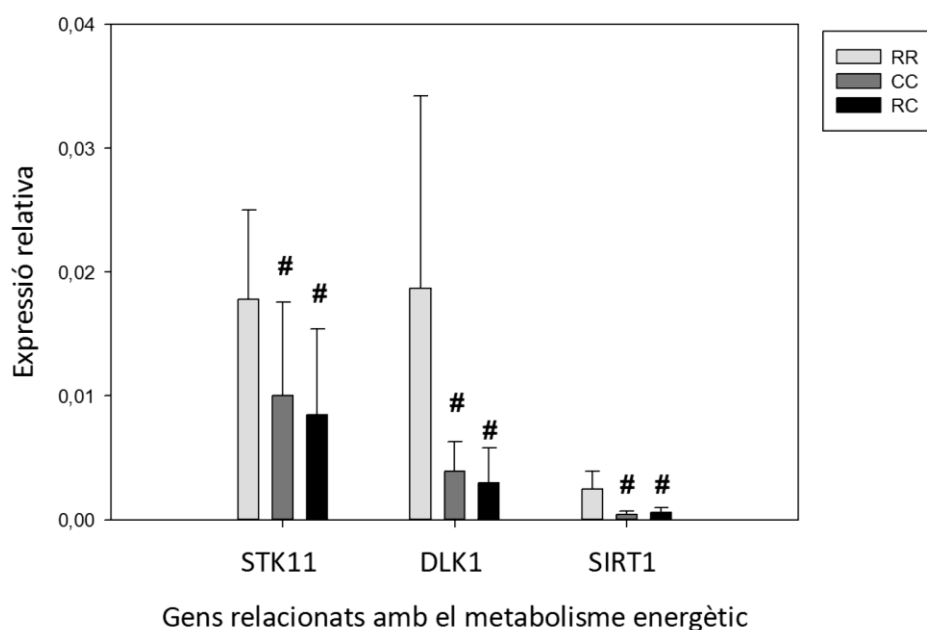


Figura 21. Expressió de *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit muscular per grups de creixement postnatal. [#] $p<0.05$ respecte a RR (prova post-hoc DMS).

5.5.2. Associació entre variables

L'expressió dels gens *STK11* i *DLK1* en el teixit muscular presenten una associació negativa amb els nivells d'insulina circulants en les cries RC ($r=-0.621$, $p=0.024$ i $r=-0.701$, $p=0.005$, respectivament; Taula 12 i Figura 22). L'expressió de *DLK1* també presenta una

associació negativa amb l'índex HOMA-IR ($r=-0.745, p=0.002$) en aquestes mateixes cries RC (Taula 12 i Figura 22).

Taula 12. Correlacions en relació a l'expressió gènica dels gens d'estudi en el teixit muscular.

TEIXIT MUSCULAR	RR		CC		RC	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Expressió relativa <i>STK11</i>						
Insulina <i>ng/ml</i>	0.115	0.751	-0.090	0.759	-0.621	0.024
Expressió relativa <i>DLK1</i>						
Insulina <i>ng/ml</i>	0.168	0.601	-0.112	0.703	-0.701	0.005
HOMA-IR	0.056	0.863	-0.288	0.318	-0.745	0.002
Expressió relativa <i>SIRT1</i>						
Glucosa <i>mg/dl</i>	-0.657	0.039	0.086	0.771	0.322	0.284
Triglicèrids <i>mg/dl</i>	-0.371	0.291	0.418	0.137	0.632	0.021

Els valors s'expressen com a *r* de Spearman. Totes les expressions relatives estan corregides pel pes de la massa magra de l'animal. Les variables d'expressió relativa han estat transformades logarítmicament (\log_{10}). RC: creixement recuperador postnatal, CC: control, RR: restringit. Significació a $p < 0.05$ (correlació bivariada de Spearman).

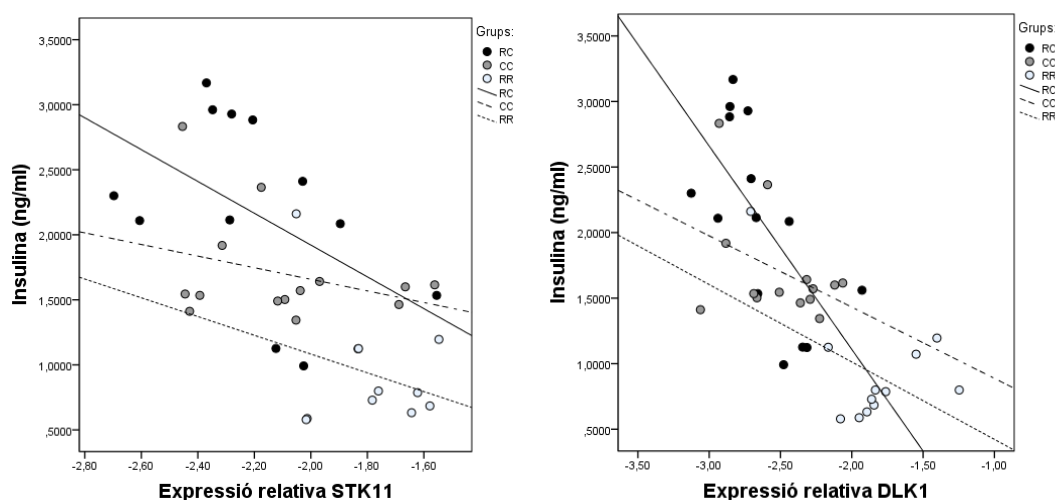


Figura 22. Correlacions entre l'expressió gènica de *STK11* i *DLK1* en el teixit muscular amb els paràmetres metabòlics d'estudi (insulina) en els diferents grups de creixement postnatal.

Per altra banda, els grups CC i RR no presenten cap associació entre l'expressió dels gens *STK11* i *DLK1* en el teixit muscular i les variables corporals o metabòliques.

L'expressió de *SIRT1* en el teixit muscular s'associa positivament amb els nivells de triglicèrids en sang ($r=0.632, p=0.021$) en les cries RC (Taula 12 i Figura 22). En canvi, en les cries RR trobem una associació negativa entre l'expressió relativa de *SIRT1* i els nivells de glucosa en plasma ($r=-0.657, p=0.039$; Taula 12 i Figura 22). Finalment, el grup CC no presenta cap associació entre l'expressió del gen *SIRT1* en el teixit muscular i les variables corporals o metabòliques.

5.6. Resum de les associacions en els teixits de regulació metabòlica.

Els resultats per als paràmetres d'expressió gènica i les correlacions significatives de les cries en el model de creixement recuperador postnatal es mostren a la taula 13.

Taula 13. Resum dels resultats d'expressió gènica dels gens d'estudi i de les correlacions significatives presentades en els teixits adipós retroperitoneal, hepàtic i muscular.

Expressió gènica	RR	CC	RC
<i>Correlacions</i>	<i>N=14</i>	<i>N=14</i>	<i>N=14</i>
TEIXIT ADIPÓS RETROPERITONEAL			
Expressió relativa <i>STK11 2-Act</i>	0.3816 ± 0.2384	0.0713 ± 0.0403 [#]	0.0542 ± 0.0313 [#]
Pes d42 g		r= -0.714	r= -0.901
Increment pes postnatal g		r= -0.714	r= -0.879
Massa grassa visceral g	r= -0.636	r= -0.767	r= -0.890
Massa grassa visceral %	r= -0.648	r= -0.798	r= -0.868
Glucosa mg/dl	r= -0.535	r= -0.596	
Triglicèrids mg/dl		r= -0.706	
Expressió relativa <i>DLK1 2-Act</i>	0.0093 ± 0.0093	0.0002 ± 0.0002 [#]	0.0001 ± 0.0001 [#]
Pes d42 g			r= -0.895
Increment pes postnatal g			r= -0.873
Massa grassa visceral g			r= -0.820
Massa grassa visceral %		r= -0.613	r= -0.789
Adiponectina total mg/l	r= -0.609		
Glucosa mg/dl			r= -0.542
Expressió relativa <i>SIRT1 2-Act</i>	0.0594 ± 0.0562	0.0163 ± 0.0150 [#]	0.0083 ± 0.0051 [#]
Massa grassa visceral %	r= -0.582	r= -0.543	
TEIXIT HEPÀTIC			
Expressió relativa <i>STK11 2-Act</i>	0.0117 ± 0.0037	0.0035 ± 0.0016 [#]	0.0041 ± 0.0021 [#]
Pes d42 g	r= -0.599		r= -0.534
Colesterol total mg/dl	r= 0.714		r= 0.645
Colesterol HDL mg/dl			r= 0.544
Expressió relativa <i>SIRT1 2-Act</i>	0.0028 ± 0.0018	0.0022 ± 0.0017	0.0016 ± 0.0009 [#]
Pes d42 g		r= 0.648	r= 0.560
Increment pes postnatal g		r= 0.648	r= 0.547
Massa grassa visceral g			r= 0.679
Massa grassa visceral %			r= 0.679
Insulina ng/ml	r= -0.624		
HOMA-IR	r= -0.659		
Triglicèrids mg/dl		r= 0.660	
TEIXIT MUSCULAR			
Expressió relativa <i>STK11 2-Act</i>	0.0178 ± 0.0072	0.0100 ± 0.0076 [#]	0.0085 ± 0.0069 [#]
Insulina ng/ml			r= -0.621
Expressió relativa <i>DLK1 2-Act</i>	0.0187 ± 0.0155	0.0039 ± 0.0024 [#]	0.0030 ± 0.0028 [#]
Insulina ng/ml			r= -0.701
HOMA-IR			r= -0.745
Expressió relativa <i>SIRT1 2-Act</i>	0.0025 ± 0.0014	0.0004 ± 0.0003 [#]	0.0006 ± 0.0004 [#]
Glucosa mg/dl	r= -0.657		
Triglicèrids mg/dl			r= 0.632

Els valors s'expressen com a mitjana ± desviació estàndard i com a r de Spearman. Totes les expressions relatives estan corregides pel pes del teixit corresponent. Les variables d'expressió relativa han estat transformades logarítmicament (log10). RC: creixement recuperador postnatal, CC: control, RR: restringit. [#] p<0.05 respecte a RR (prova post-hoc DMS) i mostrem només r amb significació a p<0.05 (correlació bivariada de Spearman).

5.7. Efecte de la restricció prenatal en el metabolisme energètic mitjançant l'estudi de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit placentari.

5.7.1. Comparació entre grups.

Els resultats per als paràmetres d'expressió gènica en la placenta en el model de restricció calòrica durant la gestació es mostren a les taules 14 i 15, i es presenten separats segons grup control (C) i grup restringit (R).

L'expressió relativa dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en la placenta i de les proteïnes *STK11* i *SIRT1* no van mostrar diferències significatives entre els grups d'estudi: control o restringit (Taula 14, Figura 23 i Figura 24).

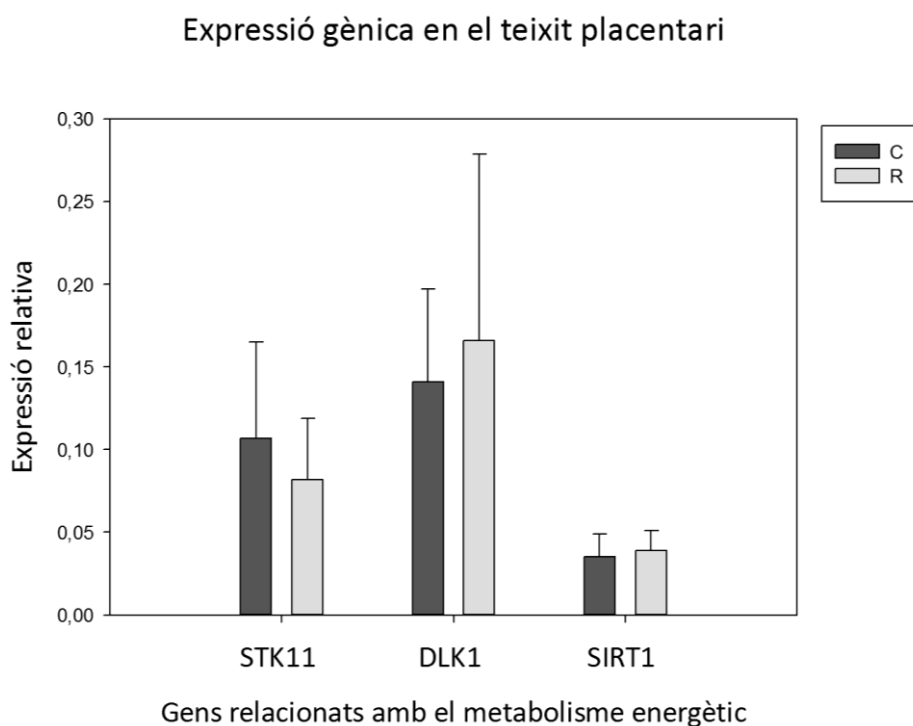


Figura 23. Expressió de *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en la placenta per grups de creixement postnatal.

Taula 14. Variables d'expressió gènica en la placenta.

TEIXIT PLACENTARI	C	R	p
<i>Expressió gènica</i>	<i>N=20</i>	<i>N=20</i>	
Expressió relativa <i>STK11 2-Act</i>	0.1077 ± 0.0583	0.0825 ± 0.0379	0.214
Expressió relativa <i>DLK1 2-Act</i>	0.1409 ± 0.0563	0.1663 ± 0.1131	0.945
Expressió relativa <i>SIRT1 2-Act</i>	0.0348 ± 0.0143	0.0387 ± 0.0127	0.423
Proteïna <i>STK11 ng/g</i>	0.6461 ± 0.3038	0.8705 ± 0.6693	0.573
Proteïna <i>SIRT1 ng/g</i>	2.4663 ± 1.9422	3.8355 ± 2.7196	0.808

Els valors s'expressen com a mitjana ± desviació estàndard. Totes les expressions relatives i nivells de proteïna estan corregides pel pes del teixit placentari. C: control, R: restringit. Significació a p<0.05 (prova de Mann-Whitney).

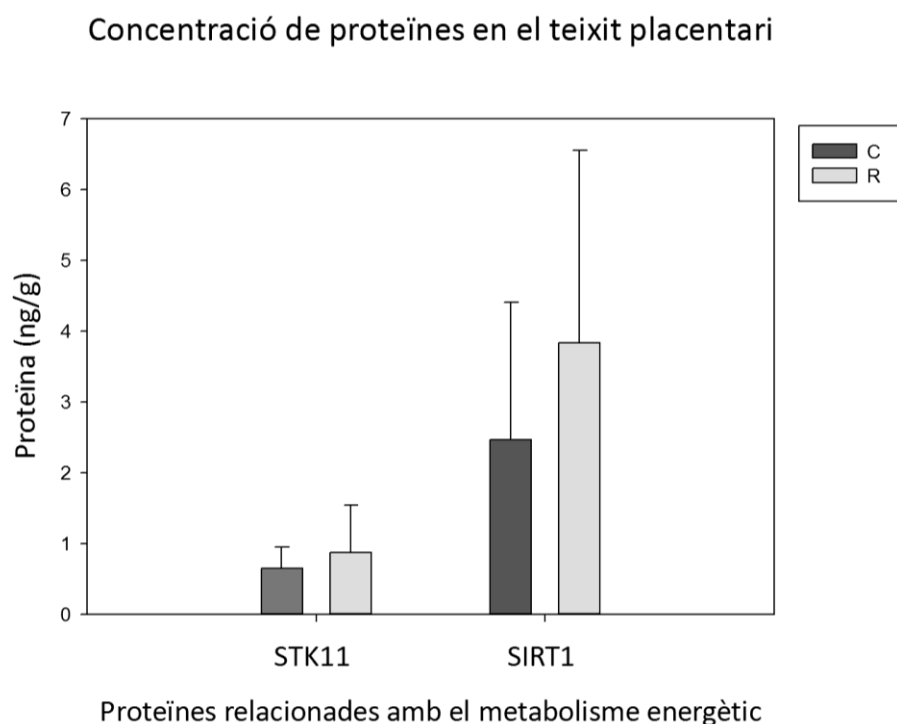


Figura 24. Concentració de proteïna *STK11* i *SIRT1* en la placenta per grups de creixement postnatal.

5.7.2. Associació entre variables.

L'expressió del gen *STK11* en la placenta presenta una associació negativa amb el pes placentari ($r=-0.590$, $p=0.010$) en el grup C (Taula 15 i Figura 25). I l'expressió del gen *DLK1* en el teixit placentari presenta una associació negativa amb el pes de la placenta ($r=-0.549$, $p=0.027$) i el pes de la cria al naixement ($r=-0.578$, $p=0.019$) en el grup R (Taula 15 i Figura 25).

Taula 15. Correlacions de les variables en relació a l'expressió gènica dels gens d'estudi en el teixit placentari.

TEIXIT PLACENTARI	C		R	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Expressió relativa <i>STK11</i>				
Pes placenta	-0.590	0.010	-0.374	0.154
Expressió relativa <i>DLK1</i>				
Pes placenta	-0.428	0.077	-0.549	0.027
Pes cria P0	-0.083	0.745	-0.578	0.019

Els valors s'expressen com a *r* de Spearman. Totes les expressions relatives i nivells de proteïna estan corregides pel pes del teixit placentari. Les variables d'expressió relativa *DLK1*, *SIRT1* han estat transformades logarítmicament (log10). RC: creixement recuperador postnatal, CC: control, RR: restringit. Significació a $p < 0.05$ (correlació bivariada de Spearman).

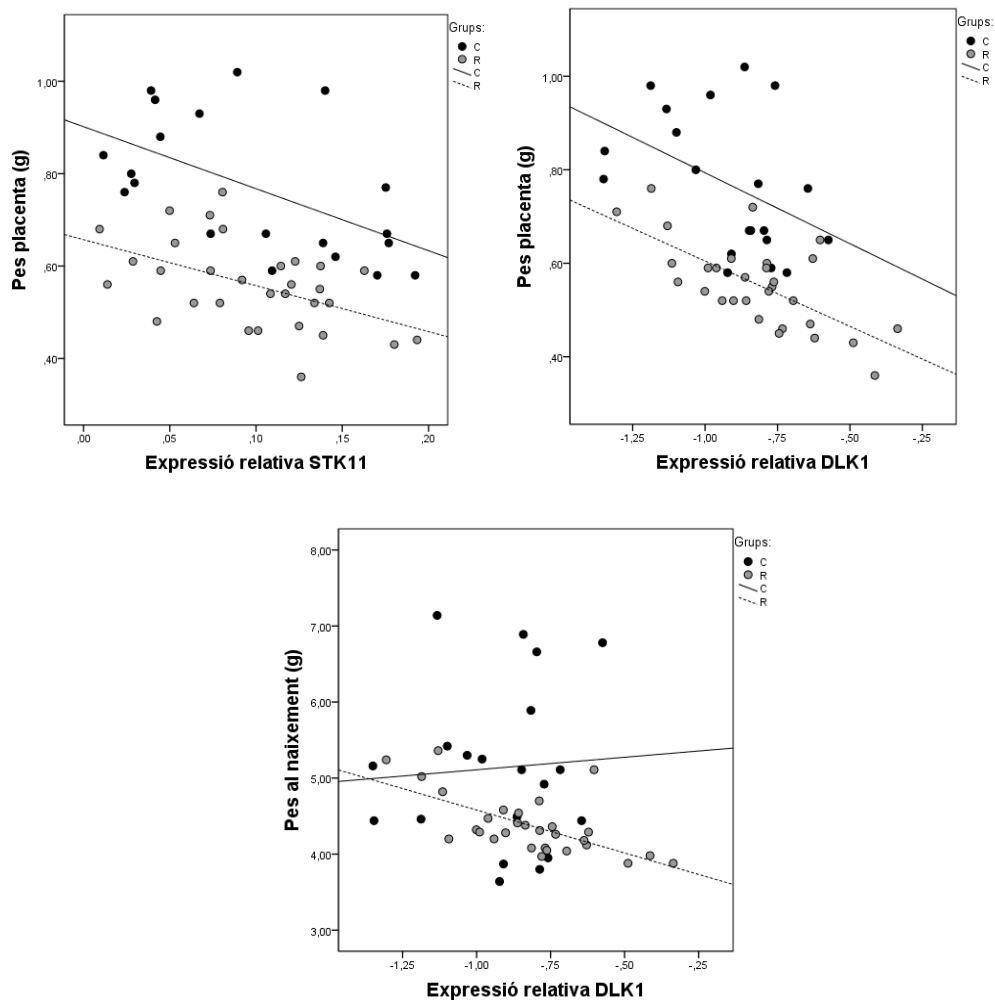


Figura 25. Correlacions entre l'expressió gènica de *STK11* i *DLK1* en el teixit placentari amb els paràmetres corporals d'estudi (pes placentari i pes al naixement) en els diferents grups de creixement postnatal.

DISCUSSIÓ

6.1. Model de restricció fetal.

6.1.1. Establiment del model.

Els models d'experimentació animal en rata (espècie *Rattus norvegicus*) han estat molt utilitzats en estudis fetals i neonatals per la gran similitud entre la placenta humana i la murina. Les rates *Wistar* són rates albines, de creixement normal i de fàcil maneigament, utilitzades àmpliament en recerca biomèdica. Sovint les rates albines han estat utilitzades per comprovar els efectes de la nutrició sobre el desenvolupament i la fisiologia. El creixement intrauterí restringit en aquests models animals es pot obtenir mitjançant fàrmacs, cirurgia (per lligament de les artèries intrauterines) o modificant la dieta (a través de restricció proteica o restricció calòrica), i s'ha descrit un assoliment correcte de la restricció fetal mitjançant els tres procediments [100][101][102][103][104]. En aquest estudi, i d'acord amb l'experiència prèvia i els recursos materials i de personal disponibles, es va utilitzar aquesta última opció: modificar l'aportació calòrica de la dieta per aconseguir una restricció fetal. Estudis previs han utilitzat rangs que varien des d'un 30% a un 50% de restricció calòrica de les rates gestants [103][104]. A partir d'aquestes referències prèvies, en aquest treball vam aplicar una restricció calòrica del 50% respecte al grup control per establir el model animal de restricció fetal.

Els nostres resultats mostren com les rates gestants restringides van presentar una restricció de pes a partir del dia 7 i durant tota la gestació respecte a les rates gestants control. Al final de la gestació, les rates gestants restringides van presentar menor pes corporal i menor acumulació de massa grassa. És àmpliament conegut que durant la gestació hi ha un reajustament del metabolisme matern a través de la utilització de les reserves maternes basals per assolir els requeriments fetals. En el cas de la restricció fetal, la mobilització de les reserves maternes per suplir la restricció de la progènia es dona encara amb més mesura, esgotant així les reserves maternes quasi en la seva totalitat [105]. En el nostre estudi experimental, les rates gestants restringides van parir cries amb un creixement fetal restringit, les quals presentaren una disminució del 14% del pes al naixement en comparació amb les cries control. Al moment de la cesària al dia 20, aquestes rates gestants restringides, a més a més de parir cries amb baix pes, van presentar placentes amb menor pes respecte a les rates gestants control. A més, també es va constatar que el model era viable fins al moment de la cesària i es va poder obtenir les mostres de la placenta per als estudis posteriors.

Podem afirmar, doncs, que el model de restricció fetal ha estat ben establert amb restricció calòrica del 50% respecte al grup control.

6.1.2. Paràmetres metabòlics en rates gestants.

El reajustament del metabolisme matern per assolir els requeriments fetals implica la mobilització de nutrients materns com la glucosa o els àcids grassos lliures, i els nivells circulants de colesterol i triglicèrids augmenten a mesura que avança la gestació per assegurar els requeriments fetals que s'incrementen durant tota la gestació [106].

En aquest treball, les rates gestants restringides van presentar majors nivells d'adiponectina i menors nivells de colesterol total respecte a les rates gestants control al final de la gestació.

Es coneix àmpliament que els nivells d'adiponectina circulants disminueixen quan hi ha una acumulació de massa grassa, sobretot visceral i que aquesta disminució d'adiponectina circulant s'associa amb la resistència a la insulina i la disfunció metabòlica [107]. Els alts nivells d'adiponectina circulant observats en les rates gestants restringides poden ser un reflex de l'acumulació quasi inexistent de massa grassa, sobretot visceral, en aquestes rates gestants restringides, que han utilitzat la baixa aportació de calories de la dieta i la mobilització de les reserves de greix basals exclusivament per al desenvolupament dels fetus.

De manera similar, els baixos nivells de colesterol en plasma observats en aquestes rates gestants restringides possiblement són el reflex de l'esgotament de les reserves materns i la baixa acumulació del teixit adipós d'aquestes rates gestants que fan que al final de la gestació no tinguin la capacitat de mobilitzar nutrients suficients per suplir els requeriments fetals. La mobilització insuficient de nutrients en el grup de restricció calòrica és la causa més plausible de la restricció de pes fetal induïda en aquest grup experimental.

Podem afirmar, doncs, que les rates gestants restringides mobilitzen quasi en la seva totalitat les seves reserves de greix durant la gestació per suplir els requeriments fetals, però malgrat això els nutrients mobilitzats no són suficients per evitar la restricció fetal.

6.2. Model de creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal.

6.2.1. Establiment del model.

Estudis previs han descrit diversos mètodes per simular el creixement recuperador postnatal observat en els éssers humans. En són exemples: proporcionar a les rates gestants durant la lactància una dieta de sobrenutrició; reduir significativament el nombre de cries per

llogridada; establir un model de lactància amb rates adoptives per reduir l'efecte de la restricció prèvia o bé restablir una dieta estàndard en les rates gestants durant la lactància després d'una gestació amb dieta restringida [108][109][110][38]. A partir d'aquestes referències prèvies, el mètode escollit en aquest treball va ser restablir una dieta estàndard en les rates gestants durant la lactància després d'una gestació amb dieta restringida. D'aquesta manera, vam modificar la ingesta de les rates gestants restringides durant la gestació a una dieta estàndard durant l'al·letament per establir el grup de creixement recuperador postnatal (RC); mentre que en els grups de creixement control (CC) i creixement restringit (RR) es va mantenir la mateixa dieta tant en la gestació com durant l'al·letament.

Els resultats mostren com les cries del grup RC van presentar un creixement recuperador postnatal caracteritzat per un major increment de pes durant els primers 42 dies de vida postnatal.

Podem afirmar, doncs, que el model de creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal es pot aconseguir a partir de la creació d'un grup de rates gestants amb restricció calòrica al del 50% respecte al grup control i amb un grup de creixement recuperador revertint aquesta restricció calòrica amb una dieta estàndard durant l'al·letament.

6.2.2. Paràmetres corporals de les cries.

Clínicament s'observa un guany de pes accelerat en els primers mesos de vida postnatal en nadons nascuts amb baix pes [100] que pot contribuir a l'aparició de resistència a la insulina [18][111] i l'aparició de l'esteatosi hepàtica [112]. Alguns estudis han descrit la presència d'una pèrdua de la funció de les cèl·lules beta del pàncrees en rates amb restricció fetal i una atròfia de les illes pancreàtiques durant el creixement recuperador postnatal [100][102].

Els nostres resultats mostren com les cries del grup RC presenten un creixement recuperador postnatal caracteritzat per un major pes corporal, un major increment de pes i una major acumulació de massa grassa, i concretament de la massa grassa visceral, el dia postnatal 42. Aquests resultats, i d'acord amb altres estudis previs, mostren com l'acumulació excessiva de teixit adipós, específicament de teixit adipós visceral, en el grup amb creixement recuperador postnatal i per tant suggereix que és aquesta acumulació en els primers estadis de la vida la que es relaciona amb els desordres metabòlics a llarg termini.

Per altra banda, aquestes cries amb creixement recuperador postnatal van mostrar un menor pes del pàncrees en proporció amb el pes corporal. Possiblement el creixement recuperador indueix una disfunció en el pàncrees a través de l'atrofia de les illes pancreàtiques que es reflecteix amb un menor pes d'aquest òrgan i suggerint així un possible mecanisme que pot contribuir a l'aparició de la insulinoresistència durant el creixement recuperador postnatal.

Podem afirmar, doncs, que el grup amb creixement recuperador postnatal presenta una acumulació excessiva del teixit adipós, específicament del teixit adipós visceral, tot i que no descartem també una acumulació de teixit adipós en altres localitzacions.

6.2.3. Paràmetres metabòlics de les cries.

Com ja hem esmentat anteriorment, es coneix àmpliament que els nivells d'adiponectina circulants disminueixen quan hi ha una acumulació de massa grassa, sobretot, visceral [107]. Uns nivells alts d'adiponectina circulant s'associen amb la disminució dels nivells de glucosa i triglicèrids circulants i amb major sensibilitat a la insulina [113]. L'adiponectina té un efecte protector en el fetge: incrementa l'oxidació dels àcids grassos, redueix la síntesi de lípids i la producció de glucosa i prevé l'esteatosi hepàtica a través de l'activació de AMPK [114][115]. Nivells elevats d'àcids grassos circulants també es relacionen amb la resistència a la insulina ja que inhibeixen la captació de la glucosa i la síntesi de glucogen i estimulen la producció hepàtica de glucosa [116]. A més, la resistència perifèrica a la insulina s'ha relacionat amb l'acumulació de triglicèrids en el fetge i en el múscul [117]. Un índex àmpliament utilitzat en clínica, i validat també en models animals amb rates *Wistar*, és l'índex HOMA-IR de resistència a la insulina.

Els nostres resultats mostren com el grup RC presenta una disminució de l'adiponectina total i un augment dels triglicèrids en plasma en comparació amb el grup RR. Podem suggerir que aquesta disminució d'adiponectina observada durant l'acumulació de massa grassa visceral del creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal reflecteix una desregulació de la secreció de citocines del teixit adipós, que pot relacionar-se amb l'aparició de resistència a la insulina i els desordres metabòlics. A més, els nivells alts de triglicèrids en plasma observats també en aquest grup de creixement recuperador postnatal s'han relacionat a la literatura amb una reducció dels nivells d'adiponectina circulant, amb l'acumulació de greix en el teixit adipós, i també amb una desregulació en l'oxidació i emmagatzematge d'àcids grassos i triglicèrids en el fetge. Els nostres resultats també mostren com les cries del grup RC presenten un valor de HOMA-IR significativament més elevat, i per tant presenten major

resistència a la insulina. Aquest resultat està d'acord amb els estudis previs que relacionen l'efecte del creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal i un estat de resistència a la insulina. Podem apuntar que en un estadi primerenc de la vida, el dia postnatal 42, existeix una desregulació metabòlica com la insulinoresistència la qual podrà contribuir a l'aparició de malalties metabòliques en l'edat adulta.

Podem afirmar, doncs, que les cries amb creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal presenten una disminució de l'adiponectina i un augment dels triglicèrids circulants, i també un augment del valor de HOMA-IR que reflecteixen una desregulació metabòlica al dia postnatal 42.

6.3. Estudi de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal.

A partir de l'estudi en el model animal de creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes fetal s'han observat canvis en l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal de les cries. Concretament hem observat que les cries RC, i també les cries CC, presenten una disminució de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* i de les proteïnes *STK11* i *SIRT1* respecte a les cries RR en el teixit adipós retroperitoneal. Els nostres resultats estan d'acord amb un estudi recent que ha descrit una disminució del contingut de proteïna *STK11* en el teixit adipós en el grup de cries que exhibien un guany de massa grassa accelerat en un model animal d'obesitat induïda per la dieta en rates adultes [118]. Un estudi similar mostra com cries RR amb restricció postnatal addicional a una restricció fetal presenten una sobreexpressió del gen *DLK1* en el teixit adipós epididimari, però no han estudiat altres teixits adiposos viscerals [100]. En la mateixa direcció que els nostres resultats, un altre estudi també mostra com els nivells de proteïna *SIRT1* estan reduïts en el teixit adipós dels ratolins (*Mus musculus*) que acumulen més massa grassa en un model d'obesitat induït per una dieta rica en greixos [119].

En el grup RR observem que l'expressió del gen *STK11* es relaciona negativament amb la glucosa i amb el greix visceral. L'augment de l'expressió del gen *STK11* explicaria els valors baixos d'HOMA-IR i la poca acumulació de greix visceral observat en aquestes cries RR. Aquestes associacions estan d'acord amb estudis anteriors que descriuen l'efecte antiobesogènic del gen *STK11* pel seu paper en la inhibició de la diferenciació dels adipòcits i la inhibició de l'adipogènesi [120], la inhibició de la síntesi tant d'àcids grassos com de colesterol

[121] i la millora la sensibilitat a la insulina a través de l'activació la via *STK11-AMPK* [62]. Els animals amb sobreexpressió de *DLK1* esdevenen resistents a la obesitat induïda per una dieta rica en greixos i en els quals l'expressió gènica de *DLK1* en el teixit adipós s'ha relacionat amb una reducció de la massa grassa corporal [76] [79]. Els nostres resultats mostren una associació negativa entre l'expressió de *DLK1* i l'adiponectina circulant. Això sembla contradictori ja que mantenir una expressió elevada del gen *DLK1* prevé l'acumulació de greix visceral i esperaríem que consegüentment augmentés els nivells d'adiponectina circulants. Tot i això, existeixen estudis previs que mostren una associació negativa entre l'expressió de *DLK1* i l'adiponectina en un model de sobreexpressió del gen *DLK1* en el teixit adipós en el qual el teixit adipós redueix la capacitat d'acumular triglicèrids, però també la de secretar adipocines com l'adiponectina [77]. Possibles explicacions per a aquestes troballes serien o bé un mecanisme compensatori de l'augment de l'adiponectina o bé una distròfia d'aquest teixit adipós, les quals s'haurien de comprovar en futurs estudis.

Finalment, en aquest grup RR l'expressió del gen *SIRT1* es relaciona negativament amb la massa grassa visceral. L'augment d'expressió del gen *SIRT1* podria evitar la mobilització de triglicèrids en sang i influir en la baixa acumulació de greix visceral observada en aquest estudi i descrita també en estudis previs que mostren com el gen *SIRT1* s'activa durant períodes de dejuni o de privació d'energia i és capaç d'unir-se a gens lipogènics per inhibir-ne la seva activitat i reduir l'acumulació de greix en el teixit adipós [91][122].

En el grup CC, el gen *STK11* es relaciona negativament amb la glucosa i els triglicèrids, i també amb el pes corporal, l'increment de pes i el greix visceral. A més a més, l'expressió dels gens *DLK1* i *SIRT1* també es relacionen negativament amb el greix visceral. En aquestes cries CC l'expressió atenuada dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal explicaria l'augment del pes corporal, l'increment de pes i del greix visceral. Experimentalment s'ha observat com la supressió de *SIRT1* en adipòcits provoca una inflamació de baix grau crítica per al desenvolupament de l'obesitat [93] i que una reducció en els nivells d'expressió de mRNA de *SIRT1* en el teixit adipós, tant subcutani com visceral, es correlaciona negativament amb l'acumulació del greix visceral [51][123].

En el grup RC s'observa que l'expressió dels gens *STK11* i *DLK1* es relaciona negativament amb el pes corporal, l'increment de pes i el greix visceral. A més, l'expressió del gen *DLK1* es relaciona negativament amb la glucosa. Estudis previs ja han descrit que el gen *STK11* és antiobesogènic [68][120] i que el gen *DLK1* es relaciona amb la diferenciació dels adipòcits, la inhibició de l'adipogènesi i que en els individus adults cal una subregulació de *DLK1* per a

l'expansió del teixit adipós [74][79]. A més, la baixa expressió de *DLK1* que hem observat en el grup RC i la seva relació amb el greix visceral també ha estat descrita en models animals amb ratolins amb una deleció de *DLK1* els quals mostren un increment de lípids circulants, un guany de pes accelerat, un augment de la massa grassa visceral, una mida d'adipòcits major en el teixit adipós i desenvolupen obesitat i malaltia del fetge gras al llarg de la vida [77][78][79].

A nivell histològic, s'ha descrit que el teixit adipós dels individus obesos presenta adipòcits hipertrofiats [109]. Aquesta hipertròfia del teixit adipós també s'ha descrit en les cries restringides durant alletament en un model de creixement recuperador postnatal [100]. La hipertròfia es caracteritza fisiològicament per contribuir a la disfunció adipocitària. S'ha suggerit que aquesta disfunció adipocitària és la que pot desenvolupar una adipositat excessiva, inflamació i una secreció alterada d'adipocines les quals podrien predisposar a la descendència per a desenvolupar resistència a la insulina [3].

Els nostres resultats mostren com les cries RC presenten una hipertròfia del teixit adipós retroperitoneal el dia postnatal 42, caracteritzada per un diàmetre i una àrea dels adipòcits significativament major que les grups CC i RR. Un estudi recent també ha descrit que, als 3 mesos d'edat i després de créixer amb alimentació estàndard, les cries que pateixen un creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes fetal presenten adipòcits més grans [3]. Es coneix també que els animals que presenten creixement recuperador postnatal excessiu mostren en l'edat adulta un fenotip d'obesitat caracteritzat per l'acumulació de greix visceral i la hipertròfia dels adipòcits [42]. Aquesta expansió patològica de la massa grassa es relaciona també amb un nombre baix d'adipòcits progenitors capaços de proliferar i diferenciar-se en adipòcits sans [45]. En el nostre estudi les cries de creixement recuperador postnatal encara no presenten obesitat però sí un estat preobesogènic representat per l'excés i l'hipertrofia de greix visceral. També podríem suggerir que la baixa expressió del gen *DLK1* en el teixit adipós de les cries RC indica un nombre baix de preadipòcits capaços de diferenciar-se en adipòcits sans i per aquest motiu es veu l'acumulació excessiva de greix en adipòcits madurs i hipertrofiats.

Així doncs podem afirmar que la baixa expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal en el grup de creixement recuperador postnatal secundari a restricció prenatal es relaciona amb una ràpida acumulació de greix visceral i una hipertròfia en el teixit adipós retroperitoneal, i s'associa negativament amb els nivells de glucosa i triglicèrids en plasma (Figura 26). Suggerim que aquests canvis moleculars en el teixit adipós retroperitoneal poden intervenir en la programació metabòlica de l'obesitat en l'edat adulta.

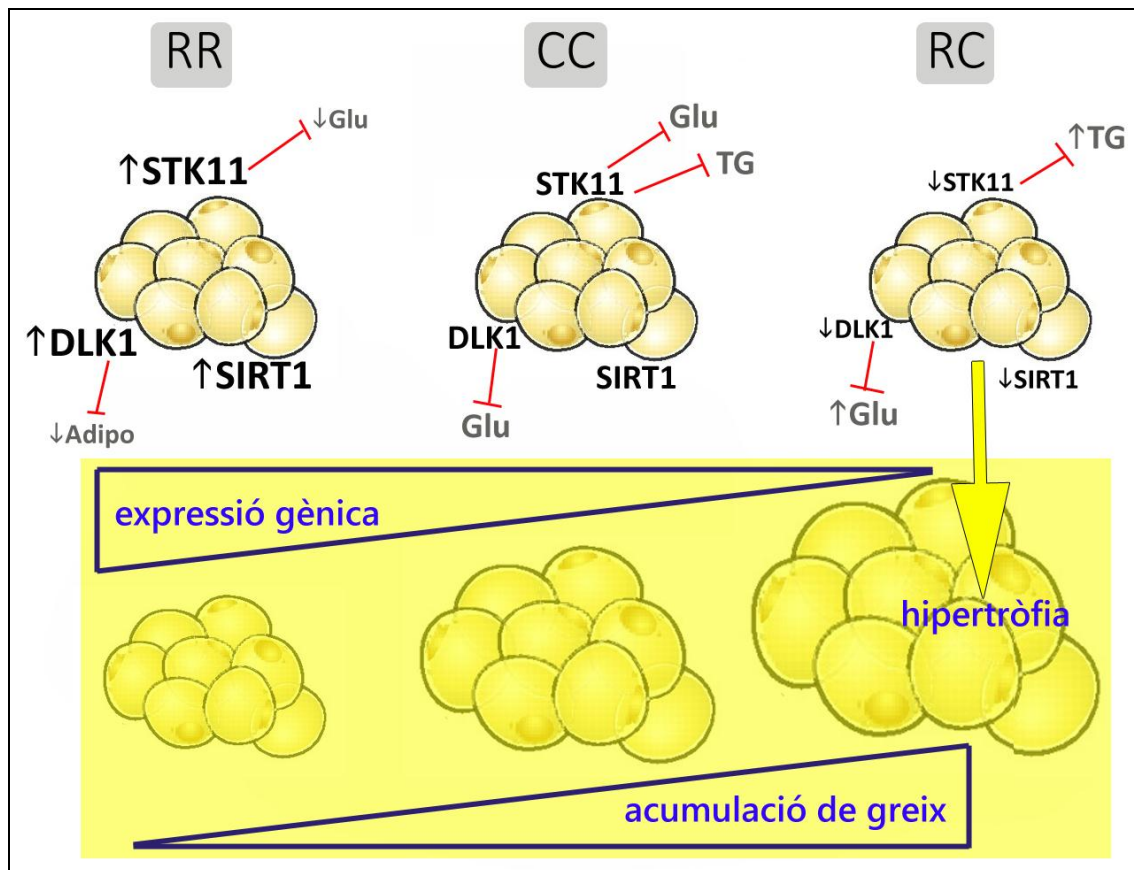


Figura 26. Model proposat per l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal en els grups de creixement recuperador postnatal i la seva relació amb el metabolisme energètic i associacions amb els paràmetres corporals i metabòlics.

6.4. Estudi de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit hepàtic.

A partir de l'estudi en el model animal de creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes fetal s'han observat canvis en l'expressió dels gens *STK11* i *SIRT1* en el teixit hepàtic de les cries. Concretament s'ha observat que les cries RC presenten una disminució de l'expressió del gen *STK11*, igual que el grup CC, i una disminució del gen *SIRT1* respecte a les cries RR en el teixit hepàtic. Cal esmentar que l'expressió del gen *DLK1* en el teixit hepàtic va ser quasi indetectable en el nostre estudi i que està d'acord amb estudis on s'ha descrit com les cèl·lules hepàtiques que presenten expressió del gen *DLK1* són cèl·lules primàries o hepatoblasts, presents en condicions normals només durant el desenvolupament embrionari [78].

En el grup RR, l'expressió del gen *STK11* es relaciona positivament amb el colesterol HDL i negativament amb el pes corporal; i l'expressió del gen *SIRT1* s'associa negativament amb l'índex HOMA-IR. En aquestes cries, una expressió elevada de *STK11* es relaciona amb major colesterol HDL circulant i menor pes corporal. S'ha descrit com l'activació de la via *STK11-AMPK* inhibeix la síntesi de triglicèrids i colesterol [124] i regula l'acumulació lipídica en el fetge, així doncs una activació de la via *STK11-AMPK* activa l'oxidació dels àcids grassos, en redueix la seva acumulació en el teixit hepàtic i prevé l'aparició de resistència a la insulina i obesitat [68][125]. Alguns autors també han descrit una via per la qual el colesterol HDL podria incidir en l'activació de *AMPK* [126] i podríem pensar que aquesta senyalització d'activació d'*AMPK* del colesterol HDL, comuna amb *STK11*, seria l'explicació de l'associació positiva observada entre les dues molècules en el nostre estudi. A més, els resultats indiquen una relació entre l'elevada expressió del gen *SIRT1* i valors baixos de l'índex HOMA-IR en aquestes cries RR. Altres autors han descrit com l'activació de la proteïna *SIRT1* incrementa la sensibilitat a la insulina i redueix l'acumulació lipídica a nivell hepàtic i suggereixen aquesta activació de *SIRT1* hepàtic com una adaptació contra la insulinoresistència amb implicacions importants per a futures dianes terapèutiques [127][128][129].

En el grup CC, l'expressió del gen *SIRT1* es relaciona positivament amb els triglicèrids, amb el pes corporal i amb l'increment de pes de les cries. Suggestim que l'expressió atenuada de *SIRT1* en aquestes cries influeix el pes corporal final però fa que alhora no s'observi una acumulació excessiva de greix visceral.

En el grup RC, l'expressió del gen *STK11* es relaciona positivament amb el colesterol HDL i negativament amb el pes corporal. A diferència del grup RR, en aquestes cries RC presenten una baixa expressió del gen *STK11* que es relaciona amb uns baixos nivells de colesterol HDL i un augment del pes corporal. Aquests resultats concorden amb estudis previs que han descrit que l'activació del *STK11* manté un fenotip antiobesogènic [120]. A més, aquestes cries presenten una associació positiva entre l'expressió del gen *SIRT1* i el pes corporal, l'increment de pes i el greix visceral. Suggestim que la baixa expressió del gen *SIRT1* en el teixit hepàtic, tot i relacionar-se amb menor pes corporal, increment de pes i greix visceral, té un efecte atenuat a nivell sistèmic i no prevé l'increment de pes i l'acumulació de greix en aquestes cries RC.

Els nostres resultats mostren com aquestes cries RC, i també les cries CC, presenten una àrea parenquimàtica significativament menor que en el grup RR la qual és un marcador indirecte de l'acumulació de lípids en el fetge [99]. Aquests resultats estan d'acord amb estudis en ratolins amb una deleció específica del gen *STK11* en el fetge que es relaciona amb l'acumulació

lipídica en aquest teixit i l'aparició d'esteatosi hepàtica [64] i que una deleció per al gen *SIRT1* es relaciona amb una ràpida acumulació de lípids hepàtics sota una dieta rica en greixos [130]. L'acumulació excessiva de lípids en el fetge causa hiperlipidèmia i desenvolupament del fetge gras. Alguns autors han descrit un alt contingut hepàtic de colesterol i triglicèrids en les cries als 21 dies d'edat postnatal d'un model murí de restricció fetal i suggereixen que el desenvolupament del fetge gras pot ser una de les primeres conseqüències de la restricció prenatal [3]. A més, aquesta acumulació de greix en el fetge pot provocar resistència a la insulina [131].

Així doncs podem afirmar que la baixa expressió dels gens *STK11* i *SIRT1* en el teixit hepàtic en el grup de creixement recuperador postnatal secundari a restricció prenatal s'associa amb l'augment de pes corporal, amb la disminució del colesterol HDL i contribueix a l'acumulació lipídica en el fetge (Figura 27). Suggerim que aquests canvis moleculars en el teixit hepàtic poden induir la malaltia del fetge gras i l'aparició de la resistència a la insulina.

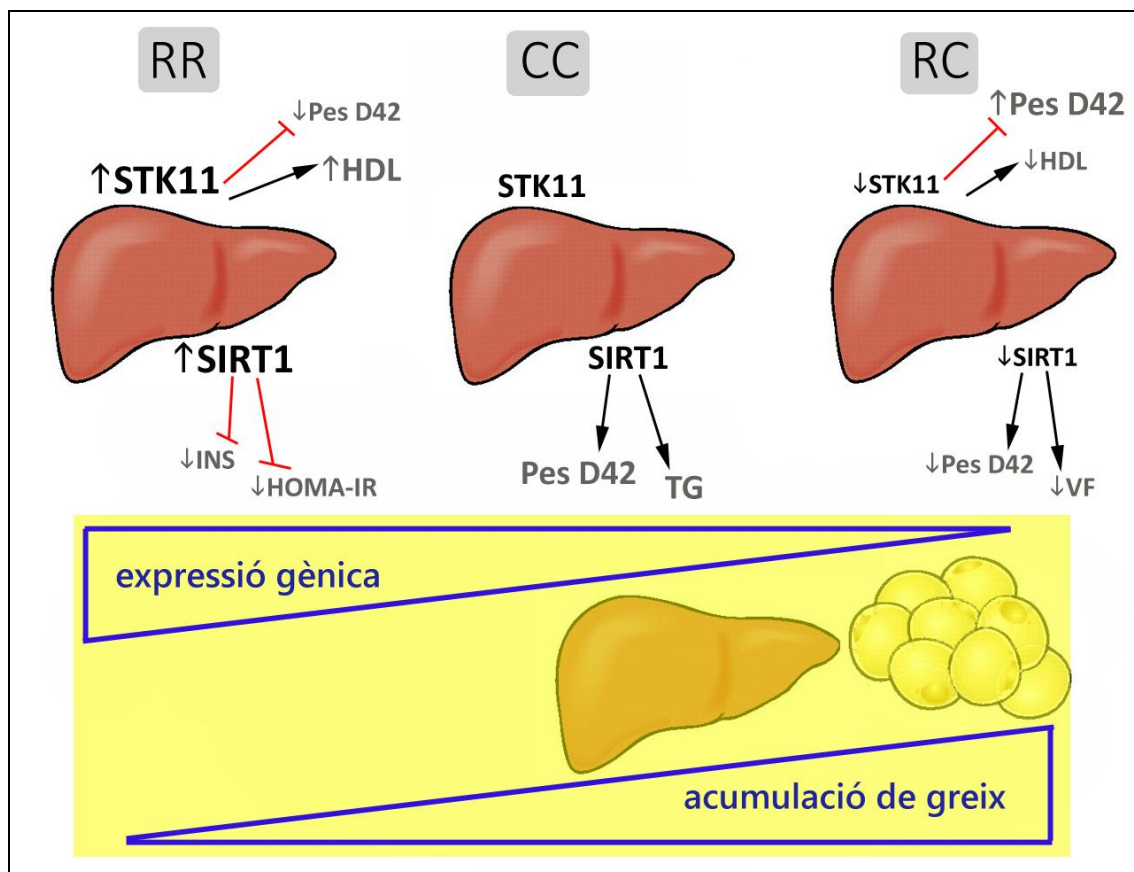


Figura 27. Model proposat per l'expressió dels gens *STK11* i *SIRT1* en el teixit hepàtic en els grups de creixement recuperador postnatal i la seva relació amb el metabolisme energètic i associacions amb els paràmetres corporals i metabòlics.

6.5. Estudi de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit muscular.

A partir de l'estudi en el model animal de creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes fetal hem observat canvis en l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit muscular de les cries. Concretament hem observat que les cries RC, i també les cries CC, presenten una disminució de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* respecte a les cries RR en el teixit muscular. Els nostres resultats estan d'acord amb estudis previs que mostren que els animals del model d'obesitat amb rates *Zucker* presenten una disminució dels nivells de *STK11* en el múscul esquelètic [132], que l'expressió de *SIRT1* en el múscul esquelètic es troba atenuada en condicions de resistència a la insulina [133] i, per altra banda, com la restricció calòrica incrementa l'activitat desacetilasa de la proteïna SIRT1 en el múscul esquelètic en ratolins i millora la senyalització de la insulina i la captació de glucosa a través de la via de senyalització PI3K-AKT [134][135].

En el grup RR observem que l'expressió de *SIRT1* es relaciona negativament amb els nivells de glucosa circulant. D'acord amb aquests resultats, diverses publicacions han observat efectes beneficiosos d'activadors de *SIRT1* sobre l'homeòstasi de la glucosa en models animals de resistència a la insulina [136]. Tot i això, un estudi recent afirma que la sobreexpressió de *SIRT1* de manera exclusiva en el múscul esquelètic no prevé de la insulinoresistència [137] encara que altres autors sí que han observat que prevé el desenvolupament de diverses complicacions metabòliques, especialment en resposta a dietes riques en greixos [138].

En el grup RC, l'expressió del gen *STK11* es relaciona negativament amb la insulina; i l'expressió relativa de *DLK1* també es relaciona negativament amb la insulina i l'índex HOMA-IR. És a dir, la baixa expressió de *STK11* i *DLK1* observada en el múscul esquelètic de les cries RC es relaciona amb un augment dels nivells d'insulina i del valor de l'índex HOMA-IR. Una baixa expressió de *STK11* en el múscul es pot relacionar amb la resistència a la insulina perquè s'ha descrit com a través de la via de senyalització *STK11*-AMPK es pot augmentar l'oxidació dels àcids grassos en el múscul esquelètic i prevenir l'acumulació de lípids intramusculars i el desenvolupament de la resistència a la insulina [139]. Estudis previs en models animals han relacionat el creixement recuperador postnatal amb un creixement recuperador en greix en detriment del múscul [10][18] i s'ha relacionat aquesta disminució de massa muscular amb un augment de la resistència a la insulina i una sobreexpressió del receptor d'insulina en el múscul [40]. En aquest mateix grup, l'expressió de *SIRT1* es relaciona positivament amb els triglicèrids.

És a dir, la baixa expressió de *SIRT1* en el múscul es relaciona amb menors nivells de triglicèrids circulants. El gen *SIRT1* també regula el metabolisme dels lípids: altres estudis han observat que una disminució de l'activitat de la proteïna SIRT1 provoca una disminució en l'expressió de gens involucrats en la oxidació dels àcids grassos i una acumulació ectòpica de lípids intramusculars [140][141]. Alguns autors han suggerit que la insulinoresistència en el múscul podria ser un esdeveniment previ a l'acumulació de greix en el fetge ja que els individus insulinoresistents presenten una disminució de la síntesi de glucogen en el múscul que llavors incrementa la lipogènesi *de novo* en el fetge [59].

Així doncs podem afirmar que la baixa expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit muscular en el grup de creixement recuperador postnatal secundari a restricció prenatal s'associa amb un augment de insulina circulant i un valor augmentat d'HOMA-IR (Figura 28). Suggerim que aquests canvis moleculars en el teixit muscular contribueixen a l'aparició d'un estat de resistència a la insulina.

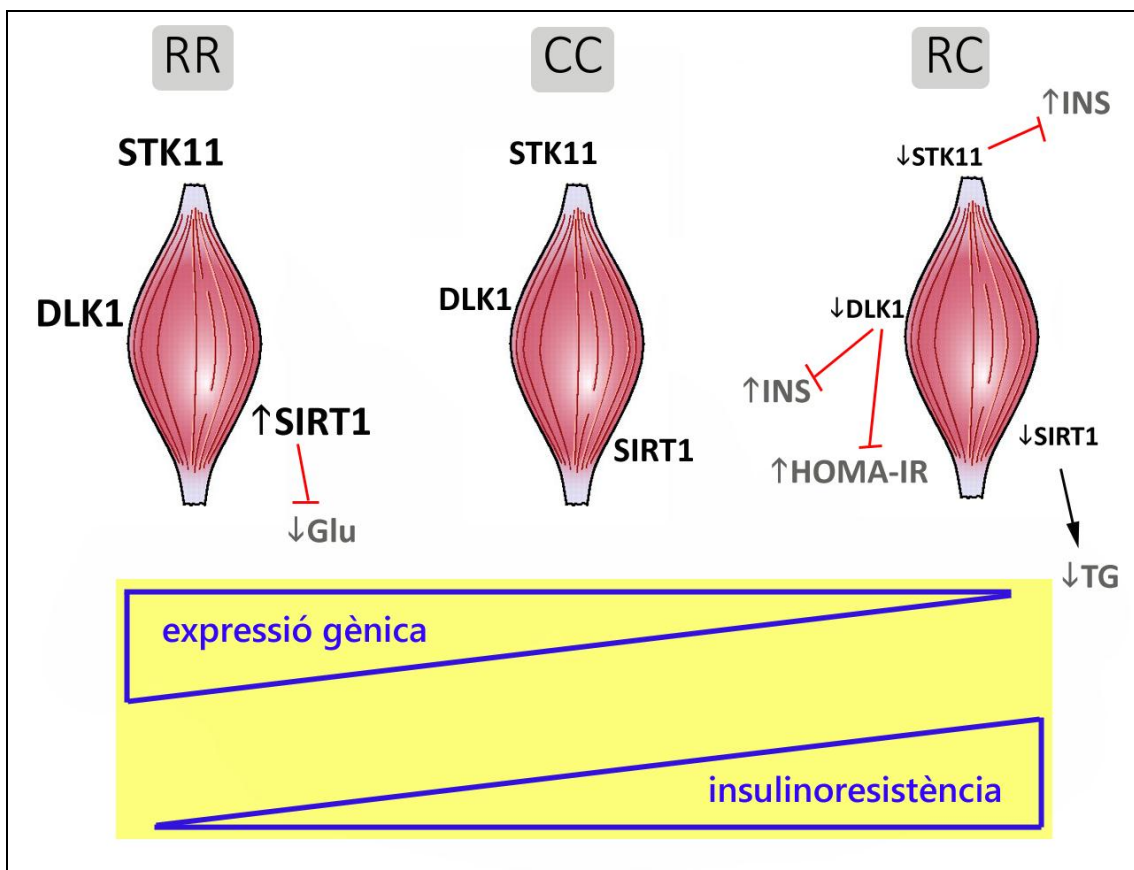


Figura 28. Model proposat per l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit muscular en els grups de creixement recuperador postnatal i la seva relació amb el metabolisme energètic i associacions amb els paràmetres corporals i metabòlics.

6.6. Estudi de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en la placenta.

Un dels objectius d'aquest treball ha estat estudiar les mostres de la placenta per el seu interès en la pràctica clínica humana. La placenta és l'únic teixit disponible en el moment del part que no suposa una intervenció extra per recol·lectar-lo i, per tant, un teixit clau per al disseny de biomarcadors de patologies en les quals la prevenció és important en els primers estadis de vida com la programació metabòlica. Malgrat el seu interès com a biomarcador també dels teixits fetals, en aquest estudi no hem pogut correlacionar el teixit placentari amb els altres teixits pel fet de no haver utilitzat un sistema de cria mitjançant adopcions després de la cesària en el model de restricció de creixement fetal. Durant el desenvolupament d'aquesta tesi, tot i que no ha estat descrit amb detall en l'apartat de material i mètodes, es van fer alguns intents experimentals amb el sistema d'adopcions que malauradament no van ser viables: les rates adoptives van rebutjar les cries adoptades. No descartem la possibilitat de millorar i repetir el mètode experimental d'adopcions en un futur per l'interès d'estudiar les mateixes cries des de l'ambient prenatal fins a l'ambient postnatal, tot i que també té altres limitacions com els canvis de microbiota i de comportament en les cries a causa del canvi de la rata mare biològica a l'adoptiva.

A partir del model animal de restricció fetal no hem observat canvis en l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* ni *SIRT1* en el teixit placentari. Malgrat tot, podem observar una tendència de l'expressió del gen *STK11* a disminuir en les placentes de les cries R respecte a les cries C. Aquesta tendència es troba en acord amb un estudi que mostra com l'embrió de ratolins amb una deleció del gen *STK11* presenta defectes neuronals i com la placenta presenta defectes vasculars importants [142]. Així doncs podem suggerir que una baixa expressió del gen *STK11* en la placenta pot generar defectes estructurals en la mateixa que desencadenin una restricció fetal.

Tot i no haver observat diferències significatives en l'expressió gènica en la placenta, no podem descartar que hi hagi canvis epigenètics com ara una hipometilació del DNA, similar a la descrita en els teixits fetals del fetge i el cervell de rates amb una restricció fetal [27]. Precisament el gen *DLK1* es troba en el domini DLK1-DIO3 conegut per ser una zona empremtada genèticament. En aquest treball no hem pogut estudiar aquests canvis epigenètics amb les tècniques utilitzades d'expressió gènica, però seria un bon objectiu en estudis futurs.

Pel que fa a les associacions entre l'expressió gènica i les variables disponibles al moment del naixement, observem que en el grup R l'expressió del gen *DLK1* presenta una associació negativa amb el pes de la placenta i el pes de la cria al néixer, és a dir, un baix pes al naixement es relaciona amb una expressió del gen *DLK1* elevada en la placenta. Estudis previs han descrit un augment de la proteïna DLK1 soluble en nadons nascuts PEG [143]. En el moment de presentar aquest treball encara no existia cap kit comercial validat en rata per quantificar la proteïna DLK1; però quantificar-la seria un bon objectiu per realitzar en estudis futurs.

Així doncs afirmem que l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit placentari del grup de restricció prenatal no presenta canvis respecte al grup control, tot i que no podem descartar una regulació epigenètica d'aquests gens que es relacioni amb la restricció fetal o amb la programació metabòlica fetal d'aquesta restricció.

6.7. Discussió conjunta.

L'objectiu principal d'aquest estudi ha estat comprovar si la programació fetal està relacionada amb canvis en l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en els teixits de les cries que presenten un creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal.

Aquest estudi ha contribuït a descriure i entendre millor els efectes metabòlics en una etapa primerenca de la vida a través del model de creixement recuperador postnatal en les cries amb restricció fetal. Per fer-ho, es van dissenyar dues fases experimentals: la primera per assolir la restricció fetal, i la segona per assolir el creixement recuperador postnatal secundari a aquesta restricció de pes prenatal.

Com era d'esperar, els resultats indiquen un bon assoliment del model mitjançant el qual es van obtenir cries amb un creixement fetal restringit. Així també en la segona fase es van obtenir cries amb restricció fetal que van presentar creixement recuperador postnatal en comparació amb les cries amb creixement postnatal lent.

Els resultats derivats d'aquesta tesi indiquen que existeixen canvis moleculars en els teixits adipós, hepàtic i muscular de les cries després d'un creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal.

Aquests canvis moleculars bàsicament mostren una disminució de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en els teixits de regulació metabòlica estudiats en el grup de de creixement recuperador. I es relacionen principalment amb els paràmetres corporals de pes el dia

postnatal 42, increment de pes durant el període postnatal i acumulació de massa grassa visceral, a més a més de relacionar-se amb paràmetres metabòlics relacionats amb el metabolisme de la glucosa i els lípids i la resistència a la insulina. Concretament, hem observat una disminució de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal que podria contribuir a l'expansió i hipertròfia d'aquest teixit i a l'acumulació de massa grassa visceral corporal. També hem observat una disminució de l'expressió dels gens *STK11* i *SIRT1* en el fetge que podria contribuir a afavorir l'acumulació de greix ectòpic intrahepàtic i també massa grassa visceral corporal. I finalment, hem observat una disminució de l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit muscular que podria contribuir a l'aparició de la resistència a la insulina durant el creixement recuperador postnatal.

La majoria dels canvis moleculars observats en el grup de creixement recuperador postnatal difereixen del grup de creixement postnatal restringit però no s'observen canvis significatius respecte al grup control, tot i que clarament es presenta una tendència lineal entre els grups de creixement postnatal. El període de creixement postnatal escollit de 42 dies, un període postnatal curt, és una possible raó pel fet de no observar canvis significatius respecte al grup control. En només 42 dies postnals les cries de creixement recuperador postnatal no han desenvolupat obesitat i per tant no es veu pròpiament un estat patològic de desregulació metabòlica. En estudis futurs es podria dissenyar un quart grup de creixement recuperador postnatal amb desenvolupament d'obesitat utilitzant una dieta rica en greixos després de l'alletament, durant el període de creixement. En altres estudis futurs també es podrien obtenir mesures més acurades de la composició corporal dels animals. Disposar de paràmetres com la relació entre el greix visceral i el subcutani, o bé quantificar els lípids intrahepàtics de manera directa o quantificar els lípids intramusculars podria ajudar a entendre com l'acumulació de massa grassa intervé en el procés de la programació fetal. De manera similar, es podrien realitzar proves més acurades per valorar la tolerància a la glucosa o la sensibilitat a la insulina com utilitzar el mètode per sobrecàrrega de glucosa o el mètode de la pinça euglucèmica (*euglycemic clamp*)[144]. I també es podria quantificar la fosforilació de les proteïnes *STK11* o *SIRT1* com a mesura de la seva activitat.

Cal esmentar que no hem trobat canvis moleculars significatius d'aquests gens en la placenta, reforçant la hipòtesi que la programació metabòlica no està influenciada només per l'etapa prenatal sinó que hi juga un paper principal l'etapa postnatal del desenvolupament. A més a més, també podríem suggerir possibles canvis epigenètics en la placenta que no eren l'objectiu d'estudi en aquest treball centrat en els canvis d'expressió gènica.

La detecció precoç dels grups de risc de patir alteracions endocrinometabòliques després d'un període de creixement recuperador postnatal en els infants nascuts PEG té una vital importància per a l'atenció neonatal i infantil. Per això estudiar els mecanismes de la programació metabòlica és clau per entendre'n la fisiopatologia i identificar nous factors genètics i ambientals que intervenen en aquest procés. Mitjançant models animals s'han replicat les alteracions descrites en els estudis epidemiològics humans i s'ha pogut aprofundir en l'estudi dels mecanismes d'aquesta programació metabòlica. La prevenció de l'obesitat infantil i de les malalties metabòliques en l'edat adulta continua essent una prioritat per als professionals clínics. Actualment es recomana una nutrició materna òptima i saludable durant l'embaràs, però les recomanacions sobre el ritme de creixement dels nounats no són tan clares. Com a norma general es creu que un bon índex de salut dels nounats durant el primer any de vida és un ritme accelerat de creixement. Però en el cas dels nounats amb restricció de pes fetal, aquest índex de "bona salut" o creixement recuperador postnatal contràriament és un dels mecanismes que contribueix en major part a la predisposició de patir desordres metabòlics al llarg de la vida. Tot i que actualment encara no és clar si els efectes beneficiosos de la restricció calòrica es poden aplicar d'igual manera a tots els estadis de la vida, els nostres resultats mostren com la restricció calòrica durant l'alletament de les cries després d'una restricció fetal manté nivells alts d'expressió de gens implicats en el metabolisme que contribueixen a reduir l'acumulació de greix durant el període postnatal. En humans també s'ha comprovat que fomentar la lactància materna en contraposició a les fórmules calòriques comercials és una mesura preventiva efectiva per modular les alteracions associades al creixement recuperador postnatal [39]. Així doncs, mesures alimentàries com fomentar l'alletament matern i la restricció calòrica moderada durant el període de creixement postnatal en nadons CIR i/o PEG poden reduir la velocitat d'aquest creixement recuperador postnatal i per tant reduir el risc metabòlic en l'edat adulta.

És evident que cal definir noves dianes terapèutiques per a la prevenció del ràpid augment de pes dels nadons CIR i/o PEG durant els primers mesos de vida i per assegurar-los millors condicions de salut a llarg termini. Esperem que en un futur no molt llunyà es podran dissenyar aquestes teràpies a partir d'estudis com el present que cerquin nous mecanismes moleculars en els teixits adipós, hepàtic, muscular i placentari que expliquin les contribucions de l'ambient nutricional en els creixements pre i postnats en la regulació del metabolisme.

CONCLUSIONS

- 1- A partir d'un model de restricció fetal durant la gestació s'obtenen cries restringides respecte al grup control.
- 2- Les rates gestants restringides consumeixen quasi en la seva totalitat les seves reserves de greix durant la gestació per suplir els requeriments fetals, però tot i això els nutrients mobilitzats no son suficients per evitar la restricció fetal.
- 3- A partir d'un grup de rates gestants amb restricció calòrica al 50% respecte al grup control durant la gestació, però amb dieta estàndard durant l'al·letament, es poden aconseguir cries que presentin creixement recuperador postnatal.
- 4- Les cries amb creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal presenten una acumulació excessiva del teixit adipós, específicament del teixit adipós visceral.
- 5- Les cries amb creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal presenten una disminució de l'adiponectina i un augment dels triglicèrids circulants i del valor de HOMA-IR al dia postnatal 42.

- 6- Les cries amb creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal presenten una baixa expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit adipós retroperitoneal la qual es relaciona amb acumulació de greix visceral i hipertròfia en el teixit adipós retroperitoneal i s'associa negativament amb els nivells de glucosa i triglicèrids en plasma.
- 7- Les cries amb creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal presenten una baixa expressió dels gens *STK11* i *SIRT1* en el teixit hepàtic la qual s'associa amb l'augment de pes corporal, amb la disminució del colesterol HDL i l'acumulació lipídica en el fetge.
- 8- Les cries amb creixement recuperador postnatal secundari a restricció de pes prenatal presenten una baixa expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit muscular la qual s'associa amb major insulina circulant i HOMA-IR.
- 9- Les cries amb restricció de pes prenatal no presenten diferències en l'expressió dels gens *STK11*, *DLK1* i *SIRT1* en el teixit placentari respecte al grup control.

BIBLIOGRAFIA

- [1] D. J. Barker, C. Osmond, J. Golding, D. Kuh, and M. E. Wadsworth, "Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease.," *BMJ*, vol. 298, no. 6673, pp. 564–7, Mar. 1989.
- [2] O. R. Vaughan, A. N. Sferruzzi-Perri, P. M. Coan, and A. L. Fowden, "Environmental regulation of placental phenotype: implications for fetal growth.," *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 24, no. 1, pp. 80–96, Jan. 2011.
- [3] D. E. Duque-Guimarães and S. E. Ozanne, "Nutritional programming of insulin resistance: causes and consequences.," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 24, no. 10, pp. 525–35, Oct. 2013.
- [4] L. H. Lumey, A. D. Stein, H. S. Kahn, K. M. van der Pal-de Bruin, G. J. Blauw, P. A. Zybert, and E. S. Susser, "Cohort profile: the Dutch Hunger Winter families study.," *Int. J. Epidemiol.*, vol. 36, no. 6, pp. 1196–204, Dec. 2007.
- [5] A. D. Stein, H. S. Kahn, A. Rundle, P. A. Zybert, K. van der Pal-de Bruin, and L. H. Lumey, "Anthropometric measures in middle age after exposure to famine during gestation: evidence from the Dutch famine.," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 85, no. 3, pp. 869–76, Mar. 2007.
- [6] A. C. Ravelli, J. H. van der Meulen, R. P. Michels, C. Osmond, D. J. Barker, C. N. Hales, and O. P. Bleker, "Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine.," *Lancet*, vol. 351, no. 9097, pp. 173–7, Jan. 1998.
- [7] K. M. Godfrey, "The Role of the Placenta in Fetal Programming—A Review," *Placenta*, vol. 23, pp. S20–S27, Apr. 2002.
- [8] H. J. McArdle, H. S. Andersen, H. Jones, and L. Gambling, "Fetal programming: causes and consequences as revealed by studies of dietary manipulation in rats -- a review.," *Placenta*, vol. 27 Suppl A, pp. S56–60, Apr. 2006.
- [9] J. A. Robinson, J.S., Seamark, R.F., Owens, "Placental Function," *Aust NZ J Obs. Gynaecol*, vol. 34, no. 3, pp. 240–246, 1994.
- [10] P.-E. Mullis and P. Tonella, "Regulation of fetal growth: consequences and impact of being born small.," *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 22, no. 1, pp. 173–90, Feb. 2008.
- [11] P. J. Ellis, T. J. Morris, B. M. Skinner, C. a Sargent, M. H. Vickers, P. D. Gluckman, S. Gilmour, and N. a Affara, "Thrifty metabolic programming in rats is induced by both maternal undernutrition and postnatal leptin treatment, but masked in the presence of both: implications for models of developmental programming," *BMC Genomics*, vol. 15, no. 1, p. 49, 2014.
- [12] C. N. Hales and S. E. Ozanne, "The dangerous road of catch-up growth.," *J. Physiol.*, vol. 547, no. Pt 1, pp. 5–10, Feb. 2003.
- [13] C. N. Hales and D. J. Barker, "The thrifty phenotype hypothesis.," *Br. Med. Bull.*, vol. 60, pp. 5–20, Jan. 2001.

- [14] P. C. Hindmarsh, M. P. P. Geary, C. H. Rodeck, J. C. P. Kingdom, and T. J. Cole, "Intrauterine growth and its relationship to size and shape at birth.," *Pediatr. Res.*, vol. 52, no. 2, pp. 263–8, Aug. 2002.
- [15] V. V. Bol, A.-I. Delattre, B. Reusens, M. Raes, and C. Remacle, "Forced catch-up growth after fetal protein restriction alters the adipose tissue gene expression program leading to obesity in adult mice.," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 297, no. 2, pp. R291–9, Aug. 2009.
- [16] K. K. Ong, M. L. Ahmed, P. M. Emmett, M. A. Preece, and D. B. Dunger, "Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study.," *BMJ*, vol. 320, no. 7240, pp. 967–71, Apr. 2000.
- [17] D. J. P. Barker, C. Osmond, T. J. Forsén, E. Kajantie, and J. G. Eriksson, "Trajectories of growth among children who have coronary events as adults.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 353, no. 17, pp. 1802–9, Oct. 2005.
- [18] A. G. Dulloo, "Thrifty energy metabolism in catch-up growth trajectories to insulin and leptin resistance.," *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 22, no. 1, pp. 155–71, Feb. 2008.
- [19] S. Heinonen, P. Taipale, and S. Saarikoski, "Weights of placentae from small-for-gestational age infants revisited.," *Placenta*, vol. 22, no. 5, pp. 399–404, May 2001.
- [20] G. Pardi, A. Marconi, and I. Cetin, "Placental-fetal interrelationship in IUGR fetuses—a review," *Placenta*, 2002.
- [21] G. Enzi, V. Zanardo, F. Caretta, E. M. Inelmen, and F. Rubaltelli, "Intrauterine growth and adipose tissue development.," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 34, no. 9, pp. 1785–90, Sep. 1981.
- [22] P. D. Gluckman and M. A. Hanson, "The consequences of being born small - an adaptive perspective.," *Horm. Res.*, vol. 65 Suppl 3, pp. 5–14, Jan. 2006.
- [23] A. Niklasson, A. Ericson, J. G. Fryer, J. Karlberg, C. Lawrence, and P. Karlberg, "An update of the Swedish reference standards for weight, length and head circumference at birth for given gestational age (1977-1981).," *Acta Paediatr. Scand.*, vol. 80, no. 8–9, pp. 756–62, Jan. .
- [24] L. Proos and J. Gustafsson, "Is early puberty triggered by catch-up growth following undernutrition?," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 9, no. 5, pp. 1791–809, May 2012.
- [25] D. J. Barker, C. N. Hales, C. H. Fall, C. Osmond, K. Phipps, and P. M. Clark, "Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth.," *Diabetologia*, vol. 36, no. 1, pp. 62–7, Jan. 1993.
- [26] A. L. Siebel, A. Mibus, M. J. De Blasio, K. T. Westcott, M. J. Morris, L. Prior, J. A. Owens, and M. E. Wlodek, "Improved lactational nutrition and postnatal growth ameliorates impairment of glucose tolerance by uteroplacental insufficiency in male rat offspring.," *Endocrinology*, vol. 149, no. 6, pp. 3067–76, Jun. 2008.

- [27] K. L. Gatford, R. A. Simmons, M. J. De Blasio, J. S. Robinson, and J. A. Owens, "Review: Placental programming of postnatal diabetes and impaired insulin action after IUGR.," *Placenta*, vol. 31 Suppl, pp. S60–5, Mar. 2010.
- [28] B. Boersma and J. M. Wit, "Catch-up Growth," *Endocr. Rev.*, vol. 18, no. 5, pp. 646–61, Oct. 1997.
- [29] J. Sun, Q. Zhang, Z. Wang, and B. Yan, "Effects of nanotoxicity on female reproductivity and fetal development in animal models.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 5, pp. 9319–37, Jan. 2013.
- [30] B. M. Fonseca, G. Correia-da-Silva, and N. A. Teixeira, "The rat as an animal model for fetoplacental development: a reappraisal of the post-implantation period.," *Reprod. Biol.*, vol. 12, no. 2, pp. 97–118, Jul. 2012.
- [31] M. J. Soares, "The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface.," *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 2, p. 51, Jul. 2004.
- [32] F. Lyall, J. N. Bulmer, H. Kelly, E. Duffie, and S. C. Robson, "Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of nitric oxide.," *Am. J. Pathol.*, vol. 154, no. 4, pp. 1105–14, Apr. 1999.
- [33] R. Pijnenborg, L. Vercruyssen, and M. Hanssens, "The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies.," *Placenta*, vol. 27, no. 9–10, pp. 939–58, 2006.
- [34] I. C. McMillen and J. S. Robinson, "Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming.," *Physiol. Rev.*, vol. 85, no. 2, pp. 571–633, Apr. 2005.
- [35] A. PRADER, J. M. TANNER, and G. von HARNACK, "Catch-up growth following illness or starvation. An example of developmental canalization in man.," *J. Pediatr.*, vol. 62, pp. 646–59, May 1963.
- [36] L. M. Berends, D. S. Fernandez-Twinn, M. S. Martin-Gronert, R. L. Cripps, and S. E. Ozanne, "Catch-up growth following intra-uterine growth-restriction programmes an insulin-resistant phenotype in adipose tissue," *Int. J. Obes.*, vol. 37, no. 8, pp. 1051–1057, Dec. 2012.
- [37] S. K. Kay's and P. C. Hindmarsh, "Catch-up growth: an overview.," *Pediatr. Endocrinol. Rev.*, vol. 3, no. 4, pp. 365–78, Jun. 2006.
- [38] M. Desai, D. Gayle, J. Babu, and M. G. Ross, "Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition.," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 288, no. 1, pp. R91–6, Jan. 2005.
- [39] F. de Zegher, G. Sebastiani, M. Diaz, D. Sanchez-Infantes, A. Lopez-Bermejo, and L. Ibanez, "Body Composition and Circulating High-Molecular-Weight Adiponectin and IGF-I in Infants Born Small for Gestational Age: Breast- Versus Formula-Feeding," *Diabetes*, vol. 61, no. 8, pp. 1969–1973, May 2012.

- [40] S. E. Ozanne, "Metabolic programming in animals.," *Br. Med. Bull.*, vol. 60, pp. 143–52, Jan. 2001.
- [41] M. Desai and M. G. Ross, "Fetal programming of adipose tissue: effects of intrauterine growth restriction and maternal obesity/high-fat diet.," *Semin. Reprod. Med.*, vol. 29, no. 3, pp. 237–45, May 2011.
- [42] J. De Toro-Martín, E. Fernández-Millán, E. Lizárraga-Mollinedo, E. López-Oliva, P. Serradas, F. Escrivá, and C. Alvarez, "Predominant role of GIP in the development of a metabolic syndrome-like phenotype in female Wistar rats submitted to forced catch-up growth.," *Endocrinology*, vol. 155, no. 10, pp. 3769–80, Oct. 2014.
- [43] A. M. Valverde, M. Benito, and M. Lorenzo, "The brown adipose cell: a model for understanding the molecular mechanisms of insulin resistance," *Acta Physiol. Scand.*, vol. 183, no. 1, pp. 59–73, Jan. 2005.
- [44] R. Weiss, J. Dziura, T. S. Burgert, W. V Tamborlane, S. E. Taksali, C. W. Yeckel, K. Allen, M. Lopes, M. Savoye, J. Morrison, R. S. Sherwin, and S. Caprio, "Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 23, pp. 2362–74, Jun. 2004.
- [45] M. Lafontan, "Adipose tissue and adipocyte dysregulation.," *Diabetes Metab.*, vol. 40, no. 1, pp. 16–28, Feb. 2014.
- [46] N. Pérez-Farinós, A. M. López-Sobaler, M. Á. Dal Re, C. Villar, E. Labrado, T. Robledo, and R. M. Ortega, "The ALADINO study: a national study of prevalence of overweight and obesity in Spanish children in 2011.," *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, p. 163687, Jan. 2013.
- [47] K. D. Niswender and B. M. Beech, "Obesity: increasing awareness of novel environmental factors.," *Diabetes*, vol. 57, no. 7, pp. 1786–7, Jul. 2008.
- [48] F. Soriguer, A. Goday, A. Bosch-Comas, E. Bordiú, A. Calle-Pascual, R. Carmena, R. Casamitjana, L. Castaño, C. Castell, M. Catalá, E. Delgado, J. Franch, S. Gaztambide, J. Girbés, R. Gomis, G. Gutiérrez, A. López-Alba, M. T. Martínez-Larrad, E. Menéndez, I. Mora-Peces, E. Ortega, G. Pascual-Manich, G. Rojo-Martínez, M. Serrano-Rios, S. Valdés, J. A. Vázquez, and J. Vendrell, "Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study.," *Diabetologia*, vol. 55, no. 1, pp. 88–93, Jan. 2012.
- [49] D. I. Phillips, "Birth weight and the future development of diabetes. A review of the evidence.," *Diabetes Care*, vol. 21 Suppl 2, pp. B150–5, Aug. 1998.
- [50] E. D. Rosen and B. M. Spiegelman, "What we talk about when we talk about fat.," *Cell*, vol. 156, no. 1–2, pp. 20–44, Jan. 2014.
- [51] Lee, Lee, Choi, Desai, Lee, "Feed restriction during pregnancy/lactation induces programmed changes in lipid, adiponectin and leptin levels with gender differences in rat offspring.," *J Matern Fetal Neonatal Med.*, vol. 24, no. 9, pp. 908–14, 2013.

- [52] B. Zarrouki, N. J. Pillon, E. Kalbacher, H. A. Soula, G. Nia N'Jomen, L. Grand, S. Chambert, A. Geloën, and C. O. Soulage, "Cirsimarín, a potent antilipogenic flavonoid, decreases fat deposition in mice intra-abdominal adipose tissue.," *Int. J. Obes. (Lond)*, vol. 34, no. 11, pp. 1566–75, Nov. 2010.
- [53] E. Ferrannini, S. Camastra, S. W. Coppack, D. Fliser, A. Golay, and A. Mitrakou, "Insulin action and non-esterified fatty acids. The European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR).," *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 56, no. 2, pp. 753–61, Jul. 1997.
- [54] C. E. Nuñez, V. S. Rodrigues, F. S. Gomes, R. F. De Moura, S. C. Victorio, B. Bombassaro, E. a Chaim, J. C. Pareja, B. Geloneze, L. a Velloso, and E. P. Araujo, "Defective regulation of adipose tissue autophagy in obesity.," *Int. J. Obes. (Lond)*, vol. 37, no. 11, pp. 1473–80, Nov. 2013.
- [55] O. Z. Pérez-Gutiérrez, C. Hernández-Rocha, R. A. Candia-Balboa, M. A. Arrese, C. Benítez, D. C. Brizuela-Alcántara, N. Méndez-Sánchez, M. Uribe, and N. C. Chávez-Tapia, "Validation study of systems for noninvasive diagnosis of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease in Latin population.," *Ann. Hepatol.*, vol. 12, no. 3, pp. 416–24, Jan. .
- [56] B. Egan and J. R. Zierath, "Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation.," *Cell Metab.*, vol. 17, no. 2, pp. 162–84, Feb. 2013.
- [57] H. Budge, M. G. Gnanalingham, D. S. Gardner, A. Mostyn, T. Stephenson, and M. E. Symonds, "Maternal nutritional programming of fetal adipose tissue development: long-term consequences for later obesity.," *Birth Defects Res. C. Embryo Today*, vol. 75, no. 3, pp. 193–9, Sep. 2005.
- [58] D. M. Muoio, "Intramuscular triacylglycerol and insulin resistance: guilty as charged or wrongly accused?," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1801, no. 3, pp. 281–8, Mar. 2010.
- [59] D. Germani, A. Puglianiello, and S. Cianfarani, "Uteroplacental insufficiency down regulates insulin receptor and affects expression of key enzymes of long-chain fatty acid (LCFA) metabolism in skeletal muscle at birth," *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 7, no. 1, p. 14, 2008.
- [60] J. D. Brown, C. R. Hancock, A. D. Mongillo, J. B. Barton, A. Ryan, A. C. Parcell, W. W. Winder, and D. M. Thomson, "Effect of LKB1 deficiency on mitochondrial content, fiber type, and muscle performance in the mouse diaphragm," *Acta Physiol (Oxf)*, vol. 201, no. 4, pp. 457–466, 2012.
- [61] B. Y. Shorning and A. R. Clarke, "LKB1 loss of function studied in vivo.," *FEBS Lett.*, vol. 585, no. 7, pp. 958–66, Apr. 2011.
- [62] R. J. Shaw, "Lkb1 and Ampk control of mTOR signalling and growth," *Acta Physiol (Oxf)*, vol. 196, no. 1, pp. 65–80, 2010.
- [63] M. Daval, F. Fougère, and P. Ferré, "Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue.," *J. Physiol.*, vol. 574, no. Pt 1, pp. 55–62, Jul. 2006.

- [64] R. J. Shaw, K. A. Lamia, D. Vasquez, S.-H. Koo, N. Bardeesy, R. A. Depinho, M. Montminy, and L. C. Cantley, "The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin.," *Science*, vol. 310, no. 5754, pp. 1642–6, Dec. 2005.
- [65] F. Lan, J. M. Cacicedo, N. Ruderman, and Y. Ido, "SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 41, pp. 27628–35, Oct. 2008.
- [66] Yamada E., E. Yamada, T.-W. A. Lee, J. E. Pessin, and C. C. Bastie, "Targeted therapies of the LKB1/AMPK pathway for the treatment of insulin resistance.," *Futur. Med Chem*, vol. 2, no. 12, pp. 1785–96, Dec. 2010.
- [67] A. Alexander and C. L. Walker, "The role of LKB1 and AMPK in cellular responses to stress and damage.," *FEBS Lett.*, vol. 585, no. 7, pp. 952–7, Apr. 2011.
- [68] W. Zhang, Q. Wang, P. Song, and M.-H. M.-H. Zou, "Liver Kinase B1 Is Required for White Adipose Tissue Growth and Differentiation," *Diabetes*, vol. 62, no. 7, pp. 2347–2358, Feb. 2013.
- [69] P. Wang, R.-Y. Zhang, J. Song, Y.-F. Guan, T.-Y. Xu, H. Du, B. Viollet, and C.-Y. Miao, "Loss of AMP-activated protein kinase- α 2 impairs the insulin-sensitizing effect of calorie restriction in skeletal muscle.," *Diabetes*, vol. 61, no. 5, pp. 1051–61, May 2012.
- [70] D. G. Hardie, "The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream.," *J. Cell Sci.*, vol. 117, no. Pt 23, pp. 5479–87, Nov. 2004.
- [71] K. Sakamoto, A. McCarthy, D. Smith, K. A. Green, D. Grahame Hardie, A. Ashworth, and D. R. Alessi, "Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction," *EMBO J.*, vol. 24, no. 10, pp. 1810–1820, May 2005.
- [72] M. A. Pierotti, F. Berrino, M. Gariboldi, C. Melani, A. Mogavero, T. Negri, P. Pasanisi, and S. Pilotti, "Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multi-faceted effects.," *Oncogene*, vol. 32, no. 12, pp. 1475–87, Mar. 2013.
- [73] A. Shiota, M. Shimabukuro, D. Fukuda, T. Soeki, H. Sato, E. Uematsu, Y. Hirata, H. Kurobe, N. Maeda, H. Sakaue, H. Masuzaki, I. Shimomura, and M. Sata, "Telmisartan ameliorates insulin sensitivity by activating the AMPK/SIRT1 pathway in skeletal muscle of obese db/db mice.," *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 11, p. 139, Jan. 2012.
- [74] K. Lee, J. A. Villena, Y. S. Moon, K.-H. Kim, S. Lee, C. Kang, and H. S. Sul, "Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1).," *J. Clin. Invest.*, vol. 111, no. 4, pp. 453–61, Feb. 2003.
- [75] S. B. Mortensen, C. H. Jensen, M. Schneider, M. Thomassen, T. A. Kruse, J. Laborda, S. P. Sheikh, and D. C. Andersen, "Membrane-tethered delta-like 1 homolog (DLK1) restricts adipose tissue size by inhibiting preadipocyte proliferation.," *Diabetes*, vol. 61, no. 11, pp. 2814–22, Nov. 2012.
- [76] M. Charalambous, S. T. Da Rocha, E. J. Radford, G. Medina-Gomez, S. Curran, S. B. Pinnock, S. R. Ferrón, A. Vidal-Puig, and A. C. Ferguson-Smith, "DLK1/PREF1 regulates

- nutrient metabolism and protects from steatosis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 45, pp. 16088–93, Nov. 2014.
- [77] J. A. Villena, K. H. Kim, and H. S. Sul, "Pref-1 and ADSF/resistin: two secreted factors inhibiting adipose tissue development.," *Horm. Metab. Res.*, vol. 34, no. 11–12, pp. 664–70, Jan. .
- [78] F. A. Falix, D. C. Aronson, W. H. Lamers, and I. C. Gaemers, "Possible roles of DLK1 in the Notch pathway during development and disease.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1822, no. 6, pp. 988–95, Jun. 2012.
- [79] H. S. Sul, "Minireview: Pref-1: role in adipogenesis and mesenchymal cell fate.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 23, no. 11, pp. 1717–25, Nov. 2009.
- [80] J. M. Ntambi and K. Young-Cheul, "Adipocyte differentiation and gene expression.," *J. Nutr.*, vol. 130, no. 12, p. 3122S–3126S, Dec. 2000.
- [81] P. Bi and S. Kuang, "Meat Science and Muscle Biology Symposium: stem cell niche and postnatal muscle growth.," *J. Anim. Sci.*, vol. 90, no. 3, pp. 924–35, Mar. 2012.
- [82] X. Xu, R.-F. Liu, X. Zhang, L.-Y. Huang, F. Chen, Q.-L. Fei, and Z.-G. Han, "DLK1 as a potential target against cancer stem/progenitor cells of hepatocellular carcinoma.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 11, no. 3, pp. 629–38, Mar. 2012.
- [83] H. Zhang, J. Nøhr, C. H. Jensen, R. K. Petersen, E. Bachmann, B. Teisner, L. K. Larsen, S. Mandrup, and K. Kristiansen, "Insulin-like growth factor-1/insulin bypasses Pref-1/FA1-mediated inhibition of adipocyte differentiation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 23, pp. 20906–14, Jun. 2003.
- [84] Y. Colak, O. Ozturk, E. Senates, I. Tuncer, E. Yorulmaz, G. Adali, L. Doganay, and F. Y. Enc, "SIRT1 as a potential therapeutic target for treatment of nonalcoholic fatty liver disease.," *Med. Sci. Monit.*, vol. 17, no. 5, pp. HY5–9, May 2011.
- [85] J. N. Feige and J. Auwerx, "Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis.," *Trends Cell Biol.*, vol. 17, no. 6, pp. 292–301, Jun. 2007.
- [86] O. Al Massadi, M. Quiñones, P. Lear, C. Dieguez, and R. Nogueiras, "The brain: a new organ for the metabolic actions of SIRT1.," *Horm. Metab. Res.*, vol. 45, no. 13, pp. 960–6, Dec. 2013.
- [87] R. Vasko, S. Xavier, J. Chen, C. H. S. Lin, B. Ratliff, M. Rabadi, J. Maizel, R. Tanokuchi, F. Zhang, J. Cao, and M. S. Goligorsky, "Endothelial sirtuin 1 deficiency perpetrates nephrosclerosis through downregulation of matrix metalloproteinase-14: relevance to fibrosis of vascular senescence.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 25, no. 2, pp. 276–91, Feb. 2014.
- [88] V. K. Pulla, M. B. Battu, M. Alvala, D. Sriram, and P. Yogeeswari, "Can targeting SIRT-1 to treat type 2 diabetes be a good strategy? A review.," *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 16, no. 8, pp. 819–32, Aug. 2012.

- [89] P. Tucci, "Caloric restriction: is mammalian life extension linked to p53?," *Aging (Albany, NY)*, vol. 4, no. 8, pp. 525–34, Aug. 2012.
- [90] Z. Zheng, H. Chen, J. Li, T. Li, B. Zheng, Y. Zheng, H. Jin, Y. He, Q. Gu, and X. Xu, "Sirtuin 1-mediated cellular metabolic memory of high glucose via the LKB1/AMPK/ROS pathway and therapeutic effects of metformin.," *Diabetes*, vol. 61, no. 1, pp. 217–28, Jan. 2012.
- [91] H.-C. Chang and L. Guarente, "SIRT1 and other sirtuins in metabolism.," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 25, no. 3, pp. 138–45, Mar. 2014.
- [92] W. Pang, Y. Wang, N. Wei, R. Xu, Y. Xiong, P. Wang, Q. Shen, and G. Yang, "Sirt1 inhibits akt2-mediated porcine adipogenesis potentially by direct protein-protein interaction.," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e71576, Jan. 2013.
- [93] M. E. Kotas, M. C. Gorecki, and M. P. Gillum, "Sirtuin-1 is a nutrient-dependent modulator of inflammation.," *Adipocyte*, vol. 2, no. 2, pp. 113–8, Apr. 2013.
- [94] A. Avogaro, S. V. de Kreutzenberg, and G. P. Fadini, "Insulin signaling and life span.," *Pflugers Arch.*, vol. 459, no. 2, pp. 301–14, Jan. 2010.
- [95] M. D. M. Romero, S. Roy, K. Pouillot, M. Feito, M. Esteve, M. D. M. Grasa, J.-A. Fernández-López, M. Alemany, and X. Remesar, "Treatment of rats with a self-selected hyperlipidic diet, increases the lipid content of the main adipose tissue sites in a proportion similar to that of the lipids in the rest of organs and tissues.," *PLoS One*, vol. 9, no. 3, p. e90995, Jan. 2014.
- [96] J. Cacho, J. Sevillano, J. de Castro, E. Herrera, and M. P. Ramos, "Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats.," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 295, no. 5, pp. E1269–76, Nov. 2008.
- [97] D. Lanoix, A.-A. Lacasse, J. St-Pierre, S. C. Taylor, M. Ethier-Chiasson, J. Lafond, and C. Vaillancourt, "Quantitative PCR pitfalls: the case of the human placenta.," *Mol. Biotechnol.*, vol. 52, no. 3, pp. 234–43, Nov. 2012.
- [98] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL, "Protein measurement with the Folin phenol reagent.," *J. Biol. Chem.*, vol. 193, no. 1, pp. 265–75, Nov. 1951.
- [99] F. Liu, C. Wang, L. Zhang, Y. Xu, L. Jang, Y. Gu, X. Cao, X. Zhao, J. Ye, and Q. Li, "Metformin prevents hepatic steatosis by regulating the expression of adipose differentiation-related protein.," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 33, no. 1, pp. 51–8, Jan. 2014.
- [100] E. Somm, D. M. Vauthay, A. Guérardel, A. Toulotte, P. Cettour-Rose, P. Klee, P. Meda, M. L. Aubert, P. S. Hüppi, and V. M. Schwitzgebel, "Early metabolic defects in dexamethasone-exposed and undernourished intrauterine growth restricted rats.," *PLoS One*, vol. 7, no. 11, p. e50131, Jan. 2012.
- [101] Y. Shahkhalili, J. Moulin, I. Zbinden, O. Aprikian, and K. Macé, "Comparison of two models of intrauterine growth restriction for early catch-up growth and later development of glucose intolerance and obesity in rats.," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 298, no. 1, pp. R141–6, Jan. 2010.

- [102] R. A. Simmons, L. J. Templeton, and S. J. Gertz, "Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat.," *Diabetes*, vol. 50, no. 10, pp. 2279–86, Oct. 2001.
- [103] W. SM, "A model of intrauterine growth retardation caused by chronic maternal undernutrition in the rat: effects on the somatotrophic axis and postnatal growth.," *J Endocrinol*, 1996.
- [104] M. Desai, D. Gayle, J. Babu, and M. G. Ross, "The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype.," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 196, no. 6, pp. 555.e1–7, Jun. 2007.
- [105] L. K. Reynolds, H. P. Ho, and L. J. Taper, "Effect of caloric restriction during pregnancy on maternal and fetal body composition in the obese Sprague-Dawley rat.," *J. Nutr.*, vol. 114, no. 12, pp. 2247–55, Dec. 1984.
- [106] G. H. BEATON, "Nutritional and physiological adaptations in pregnancy.," *Fed. Proc.*, vol. 20(Suppl 7, pp. 196–201, Mar. 1961.
- [107] A. T. Turer, A. Khera, C. R. Ayers, C. B. Turer, S. M. Grundy, G. L. Vega, and P. E. Scherer, "Adipose tissue mass and location affect circulating adiponectin levels.," *Diabetologia*, vol. 54, no. 10, pp. 2515–24, Oct. 2011.
- [108] M.-C. Alexandre-Gouabau, F. Courant, G. Le Gall, T. Moyon, D. Darmaun, P. Parnet, B. Coupé, and J.-P. Antignac, "Offspring metabolomic response to maternal protein restriction in a rat model of intrauterine growth restriction (IUGR).," *J. Proteome Res.*, vol. 10, no. 7, pp. 3292–302, Jul. 2011.
- [109] F. Bieswal, M.-T. Ahn, B. Reusens, P. Holvoet, M. Raes, W. D. Rees, and C. Remacle, "The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat.," *Obesity (Silver Spring)*, vol. 14, no. 8, pp. 1330–43, Aug. 2006.
- [110] V. V Bol, B. M. Reusens, and C. A. Remacle, "Postnatal catch-up growth after fetal protein restriction programs proliferation of rat preadipocytes.," *Obesity (Silver Spring)*, vol. 16, no. 12, pp. 2760–3, Dec. 2008.
- [111] T. L. Crume, A. Scherzinger, E. Stamm, R. McDuffie, K. J. Bischoff, R. F. Hamman, and D. Dabelea, "The long-term impact of intrauterine growth restriction in a diverse U.S. cohort of children: the EPOCH study.," *Obesity (Silver Spring)*, vol. 22, no. 2, pp. 608–15, Mar. 2014.
- [112] A. Alisi, N. Panera, C. Agostoni, and V. Nobili, "Intrauterine growth retardation and nonalcoholic Fatty liver disease in children.," *Int. J. Endocrinol.*, vol. 2011, p. 269853, Jan. 2011.
- [113] S. M. Furler, S. K. Gan, A. M. Poynten, D. J. Chisholm, L. V Campbell, and A. D. Kriketos, "Relationship of adiponectin with insulin sensitivity in humans, independent of lipid availability.," *Obesity (Silver Spring)*, vol. 14, no. 2, pp. 228–34, Feb. 2006.
- [114] M. A. Bredella, M. Torriani, R. H. Ghomi, B. J. Thomas, D. J. Brick, A. V Gerweck, L. M. Harrington, and K. K. Miller, "Adiponectin is inversely associated with intramyocellular

and intrahepatic lipids in obese premenopausal women.," *Obesity (Silver Spring)*., vol. 19, no. 5, pp. 911–6, May 2011.

- [115] T. W. Jung, B.-S. Youn, H. Y. Choi, S. Y. Lee, H. C. Hong, S. J. Yang, H. J. Yoo, B.-H. Kim, S. H. Baik, and K. M. Choi, "Salsalate and adiponectin ameliorate hepatic steatosis by inhibition of the hepatokine fetuin-A.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 86, no. 7, pp. 960–9, Oct. 2013.
- [116] R. N. Bergman and M. Ader, "Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 11, no. 9, pp. 351–6, Nov. 2000.
- [117] A. Virkamäki, E. Korshennikova, A. Seppälä-Lindroos, S. Vehkavaara, T. Goto, J. Halavaara, A. M. Häkkinen, and H. Yki-Järvinen, "Intramyocellular lipid is associated with resistance to in vivo insulin actions on glucose uptake, antilipolysis, and early insulin signaling pathways in human skeletal muscle.," *Diabetes*, vol. 50, no. 10, pp. 2337–43, Oct. 2001.
- [118] Fei-Wang, D.-R. R. Tian, P. Tso, and J.-S. S. Han, "Diet-induced obese rats exhibit impaired LKB1-AMPK signaling in hypothalamus and adipose tissue.," *Peptides*, vol. 35, no. 1, pp. 23–30, May 2012.
- [119] L. Qiao and J. Shao, "SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex.," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 52, pp. 39915–24, Dec. 2006.
- [120] Y. He, Y. Li, T. Zhao, Y. Wang, and C. Sun, "Ursolic acid inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through LKB1/AMPK pathway.," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, p. e70135, Jan. 2013.
- [121] T. Zhang, N. Yamamoto, and H. Ashida, "Chalcones suppress fatty acid-induced lipid accumulation through a LKB1/AMPK signaling pathway in HepG2 cells.," *Food Funct.*, vol. 5, no. 6, pp. 1134–41, Jun. 2014.
- [122] F. Picard, M. Kurtev, N. Chung, A. Topark-Ngarm, T. Senawong, R. Machado de Oliveira, M. Leid, M. W. McBurney, and L. Guarente, "Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ ," *Nature*, vol. 429, no. 6993, pp. 771–776, Jun. 2004.
- [123] Y. S. Song, S. K. Lee, Y. J. Jang, H. S. Park, J.-H. Kim, Y. J. Lee, and Y.-S. Heo, "Association between low SIRT1 expression in visceral and subcutaneous adipose tissues and metabolic abnormalities in women with obesity and type 2 diabetes," *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 101, no. 3, pp. 341–348, Sep. 2013.
- [124] D. Carling, V. A. Zammit, and D. G. Hardie, "A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis.," *FEBS Lett.*, vol. 223, no. 2, pp. 217–22, Nov. 1987.
- [125] M. M. Assifi, G. Suchankova, S. Constant, M. Prentki, A. K. Saha, and N. B. Ruderman, "AMP-activated protein kinase and coordination of hepatic fatty acid metabolism of starved/carbohydrate-refed rats.," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 289, no. 5, pp. E794–800, Nov. 2005.

- [126] T. Kimura, H. Tomura, K. Sato, M. Ito, I. Matsuoka, D.-S. Im, A. Kuwabara, C. Mogi, H. Itoh, H. Kurose, M. Murakami, and F. Okajima, "Mechanism and role of high density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 7, pp. 4387–97, Feb. 2010.
- [127] A. S. Banks, N. Kon, C. Knight, M. Matsumoto, R. Gutiérrez-Juárez, L. Rossetti, W. Gu, and D. Accili, "SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice.," *Cell Metab.*, vol. 8, no. 4, pp. 333–41, Oct. 2008.
- [128] J. Lee, S.-W. Hong, S. W. Chae, D. H. Kim, J. H. Choi, J. C. Bae, S. E. Park, E.-J. Rhee, C.-Y. Park, K.-W. Oh, S.-W. Park, S.-W. Kim, and W.-Y. Lee, "Exendin-4 improves steatohepatitis by increasing Sirt1 expression in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice.," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, p. e31394, Jan. 2012.
- [129] M. Boutant, M. Joffraud, S. S. Kulkarni, E. García-Casarrubios, P. M. García-Roves, J. Ratajczak, P. J. Fernández-Marcos, A. M. Valverde, M. Serrano, and C. Cantó, "SIRT1 enhances glucose tolerance by potentiating brown adipose tissue function.," *Mol. Metab.*, vol. 4, no. 2, pp. 118–31, Feb. 2015.
- [130] A. Z. Caron, X. He, W. Mottawea, E. L. Seifert, K. Jardine, D. Dewar-Darch, G. O. Cron, M.-E. Harper, A. Stintzi, and M. W. McBurney, "The SIRT1 deacetylase protects mice against the symptoms of metabolic syndrome.," *FASEB J.*, vol. 28, no. 3, pp. 1306–16, Mar. 2014.
- [131] G. Boden, "Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes.," *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, vol. 111, no. 3, pp. 121–4, May 2003.
- [132] Y.-C. Chen, S.-D. Lee, C.-H. Kuo, and L.-T. Ho, "The effects of altitude training on the AMPK-related glucose transport pathway in the red skeletal muscle of both lean and obese Zucker rats.," *High Alt. Med. Biol.*, vol. 12, no. 4, pp. 371–8, Jan. 2011.
- [133] A. T. White, A. Philp, H. N. Fridolfsson, J. M. Schilling, A. N. Murphy, D. L. Hamilton, C. E. McCurdy, H. H. Patel, and S. Schenk, "High-fat diet-induced impairment of skeletal muscle insulin sensitivity is not prevented by SIRT1 overexpression.," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 307, no. 9, pp. E764–72, Nov. 2014.
- [134] S. Schenk, C. E. McCurdy, A. Philp, M. Z. Chen, M. J. Holliday, G. K. Bandyopadhyay, O. Osborn, K. Baar, and J. M. Olefsky, "Sirt1 enhances skeletal muscle insulin sensitivity in mice during caloric restriction.," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 11, pp. 4281–8, Nov. 2011.
- [135] Q. Wang, X. Sun, X. Li, X. Dong, P. Li, and L. Zhao, "Resveratrol attenuates intermittent hypoxia-induced insulin resistance in rats: involvement of Sirtuin 1 and the phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase/AKT pathway.," *Mol. Med. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 151–8, Jan. 2015.
- [136] M. Kitada and D. Koya, "SIRT1 in Type 2 Diabetes: Mechanisms and Therapeutic Potential.," *Diabetes Metab. J.*, vol. 37, no. 5, pp. 315–25, Oct. 2013.
- [137] H.-H. Zhang, G.-J. Qin, X.-L. Li, Y.-H. Zhang, P.-J. Du, P.-Y. Zhang, Y.-Y. Zhao, and J. Wu, "SIRT1 overexpression in skeletal muscle in vivo induces increased insulin sensitivity

and enhanced complex I but not complex II–V functions in individual subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria,” *J. Physiol. Biochem.*, vol. 71, no. 2, pp. 177–190, Mar. 2015.

- [138] R. E. Gilbert, K. Thai, S. L. Advani, C. L. Cummins, D. M. Kepecs, S. A. Schroer, M. Woo, and Y. Zhang, “SIRT1 activation ameliorates hyperglycaemia by inducing a torpor-like state in an obese mouse model of type 2 diabetes.,” *Diabetologia*, vol. 58, no. 4, pp. 819–27, Apr. 2015.
- [139] G. F. Merrill, E. J. Kurth, D. G. Hardie, and W. W. Winder, “AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle.,” *Am. J. Physiol.*, vol. 273, no. 6 Pt 1, pp. E1107–12, Dec. 1997.
- [140] J. Jeppesen, S. J. Maarbjerg, a. B. Jordy, a. M. Fritzen, C. Pehmoller, L. Sylow, a. K. Serup, N. Jessen, K. Thorsen, C. Prats, K. Qvortrup, J. R. B. Dyck, R. W. Hunter, K. Sakamoto, D. M. Thomson, P. Schjerling, J. F. P. Wojtaszewski, E. a. Richter, and B. Kiens, “LKB1 Regulates Lipid Oxidation During Exercise Independently of AMPK,” *Diabetes*, vol. 62, no. 5, pp. 1490–1499, Jan. 2013.
- [141] T. Shan, P. Zhang, P. Bi, and S. Kuang, “Lkb1 deletion promotes ectopic lipid accumulation in muscle progenitor cells and mature muscles.,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 230, no. 5, pp. 1033–41, May 2015.
- [142] A. Ylikorkala, D. J. Rossi, N. Korsisaari, K. Luukko, K. Alitalo, M. Henkemeyer, and T. P. Mäkelä, “Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in Lkb1-deficient mice.,” *Science*, vol. 293, no. 5533, pp. 1323–6, Aug. 2001.
- [143] F. de Zegher, M. Díaz, G. Sebastiani, A. Martín-Ancel, D. Sánchez-Infantes, A. López-Bermejo, and L. Ibáñez, “Abundance of circulating preadipocyte factor 1 in early life.,” *Diabetes Care*, vol. 35, no. 4, pp. 848–9, Apr. 2012.
- [144] S. Hulman, B. Falkner, and N. Freyvogel, “Insulin resistance in the conscious spontaneously hypertensive rat: euglycemic hyperinsulinemic clamp study.,” *Metabolism*, vol. 42, no. 1, pp. 14–8, Jan. 1993.