



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFEECTO A CORTO PLAZO DE LA SOBRENUTRICIÓN TEMPRANA EN EL
TRANSCRIPTOMA DE HIPOTÁLAMO Y TEJIDO ADIPOSEO DE RATA WISTAR
(*RATTUS NORVERGICUS*)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ESPINOZA CAMACHO MIGUEL ANGEL

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LAURA DEL BOSQUE PLATA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DR. ADOLFO RENÉ MÉNDEZ CRUZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ RAFAEL JIMÉNEZ FLORES
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., NOVIEMBRE, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO A CORTO PLAZO DE LA SOBRENUTRICIÓN TEMPRANA EN EL
TRANSCRIPTOMA DE HIPOTÁLAMO Y TEJIDO ADIPOSEO DE RATA WISTAR
(*RATTUS NORVERGICUS*)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ESPINOZA CAMACHO MIGUEL ANGEL

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LAURA DEL BOSQUE PLATA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DR. ADOLFO RENÉ MÉNDEZ CRUZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ RAFAEL JIMÉNEZ FLORES
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.**

MÉXICO, CD. MX., NOVIEMBRE, 2016



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 19 de septiembre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **ESPINOZA CAMACHO MIGUEL ÁNGEL** con número de cuenta **406081214**, con la tesis titulada **"EFECTO A CORTO PLAZO DE LA SOBRENUTRICIÓN TEMPRANA EN EL TRANSCRIPTOMA DE HIPOTÁLAMO Y TEJIDO ADIPOSO EN RATA WISTAR (*Rattus norvegicus*)"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LAURA DEL BOSQUE PLATA**:

Presidente: DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ
Vocal: DRA. MARÍA ELIZABETH TEJERO BARRERA
Secretario: DR. JOSÉ RAFAEL JIMÉNEZ FLORES
Suplente: DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA
Suplente: DR. ADOLFO RENÉ MÉNDEZ CRUZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 25 de octubre de 2016

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Primeramente agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM que me ha brindado la oportunidad de continuar mis estudios y realizar mi trabajo de investigación.

Agradezco también, la beca que me otorgó el CONACYT asociado a mi CVU 659985. De igual forma agradezco el financiamiento al proyecto 169652 dirigido por la Dra. Laura del Bosque Plata, para llevar a cabo mi investigación.

Extiendo agradecimiento a comité Tutor integrado por la tutora principal Dr. Laura del Bosque Plata, el Dr. José Rafael Jiménez Flores y el Dr. Adolfo René Méndez Cruz.

Agradecimientos personales

A la Unidad de Microarreglos y Genotipificación (INMEGEN), A los integrantes del laboratorio 1 que dirige el Dr. Enrique Hong Chong en el departamento de Farmacología del CINVESTAV sede sur, particularmente al Mtro. Gerardo Sánchez.

Al Mtro. Luis Antonio Castro Reyes y estudiantes pertenecientes al Laboratorio que dirige la Dra. Elena Zambrano González en el Instituto Nacional de Ciencias Medicas Salvador Suvirán.

Al Dr. Carlos López Victorio del Instituto de Neurobiología, UNAM.

Agradezco de manera personal a los integrantes del laboratorio de Nutrigenética y Nutrigenómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) que dirige la Dra. María Elizabeth Tejero Barrera.

Por último, extendiendo mi agradecimiento a mi familia.

A mi familia

Índice

Índice de figuras.....	i
Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Hipotálamo	4
Estructura y función del tejido adiposo blanco	6
Hiperfagia	9
Sobrenutrición	10
Programación metabólica	10
Antecedentes.....	11
Objetivos.....	12
Objetivo General.....	12
Objetivos particulares	12
Justificación y planteamiento del problema.	13
Hipótesis	14
Metodología.....	15
Modelo animal.....	15
Obtención de sangre periférica y suero	15
Obtención de tejidos y almacenamiento de muestras biológicas	15
Extracción de ARN.....	16
Ensayo de hibridación de microarreglos	17
Análisis de datos de la expresión genómica	19
Análisis de vías metabólicas.....	20
Resultados.....	21
Peso corporal, órganos y tejidos	21
Parámetros bioquímicos sanguíneos.....	27
Expresión de transcriptoma de hipotálamo y tejido adiposo.....	30
Análisis de vías.....	45
Análisis y discusión	48
Transcriptoma del tejido hipotalámico	50
Transcriptoma de tejido adiposo.....	51
Conclusiones.....	54
Literatura citada.....	55
Anexos	59

I.-Análisis de calidad de ARN de tejido hipotalámico mediante electroferogramas en bioanalizador.	59
II.-Análisis de calidad de ARN de calidad de ARN de tejido adiposo mediante electroferogramas en bioanalizador.....	60

Índice de figuras

Figura 1. Esquema general del hipotálamo humano	5
Figura 2. Peso corporal.	22
Figura 3. Peso en gramos de cerebro e hipotálamo.....	23
Figura 4. Peso en gramos de tejido adiposo e hígado	24
Figura 5. Peso en gramos de corazón y riñón.....	25
Figura 6. Valor porcentual de órganos y tejidos.	26
Figura 7. Concentración de glucosa y colesterol.....	28
Figura 8. Concentración de leptina y triglicéridos.....	29
Figura 9. Gráfica de Volcán de hipotálamo	31
Figura 10. Mapa de calor de transcritos diferencialmente expresados en el hipotálamo.....	32
Figura 11. Representación gráfica de transcritos con función regulatoria de ritmo circadiano (<i>timless</i>), apetito <i>jack1</i> y <i>lepre1</i>), inflamación (<i>cnpy4</i> , <i>jack1</i> , <i>birc6</i> , etc)	34
Figura 12. Red de interacción.	35
Figura 13. Análisis específico de la interacción entre las rutas de ritmos circadianos y resistencia a leptina.....	36
Figura 14. Análisis global de vías de señalización alteradas.....	37
Figura 15. Gráfica de Volcán de expresión de tejido adiposo.	38
Figura 16. Mapa de calor de los transcritos diferencialmente expresados en tejido	39
Figura 17. Representación gráfica de expresión relativa de transcritos con mayor diferencia en el de tejido adiposo del grupo de sobrenutrición con respecto al grupo control.	41
Figura 18. Red de interacción de tejido adiposo del grupo de sobrenutrición con respecto al grupo control.....	42
Figura 19. Análisis de vía de señalización con localización celular de tejido adiposo	43
Figura 20. Principales rutas asociadas al transcriptoma de tejido adiposo	44

Resumen

Introducción. El exceso de nutrición temprana influye en la generación de trastornos metabólicos y enfermedades crónicas degenerativas como la obesidad, el síndrome metabólico, la Diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2) y enfermedades cardiovasculares. Existen reportes de alteración del apetito y la saciedad en etapa adulta en modelos animales con sobrenutrición temprana (ST).

Objetivo. Analizar el efecto a corto plazo de la ST sobre el transcriptoma del tejido adiposo y el hipotálamo. En particular, analizar las vías metabólicas relacionadas con la regulación de los procesos de hambre, la saciedad e inflamación.

Materiales y métodos. El modelo de ST en ratas Wistar se realizó mediante reducción de crías desde el día 3 hasta el día 21 de vida. Se generaron un grupo control (n = 5) y un grupo tratamiento (n = 5), con ratas macho. El transcriptoma se analizó mediante hibridación de microarreglos de expresión (Ratgene ST 2.0, Affymetrix®), con una cobertura de 28,407 transcripciones. El análisis de vías se realizó con el programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA). El análisis estadístico se realizó en el software estadístico R, el análisis estadístico de los parámetros fenotípicos y bioquímicos fueron analizados en GraphPad Prism software 6® se aplicó la t de Student con $p < 0,05$.

Resultados. Los datos obtenidos muestran sobrepeso en el grupo de tratamiento, concentración elevada de triglicéridos y glucosa en suero, pero los niveles de colesterol no presentan cambios. El análisis del transcriptoma en el hipotálamo mostró 226 transcripciones desregulados de los cuales 98 son transcritos sub expresados y 128 sobre-expresados con un corte del log fold change de 1.5. Además. Por otro lado, el transcriptoma de tejido adiposo mostró 161 transcritos desregulados, de los cuales 61 están sobre-expresados y 100 con sub expresión. En análisis vías en hipotálamo mostró alteraciones en la inflamación, metabolismo de lípidos y ritmos circadianos. Las vías alteradas en el tejido adiposo se asociadas con inflamación, trastorno del metabolismo de los lípidos e hiper leptinemia. **Conclusión.** Se demuestra por primera vez los efectos de la ST en los transcriptomas de hipotálamo y adiposo de tejido a 21 días con repercusión morfo-funcionales. La ST genera resistencia a la insulina y la dislipidemia. Algunos de los transcritos expresados diferencialmente controlan circuitos neuronales que están implicados en el control de los ritmos circadianos en hipotálamo y la regulación endocrina (vías de leptina), esto es una evidencia de que la ST genera cambios en la regulación metabólica del hipotálamo y en el tejido adiposo con repercusión sistémica.

Abstract

Introduction. The hypercaloric nutrition is highly associated with metabolic syndrome, diabetes mellitus type 2 and cardiovascular diseases. The postnatal overnutrition (PON) influences the generation of metabolic disorders such as obesity and dyslipidemia. Recent reports in animal models with hypercaloric diet show changes in the concentration of peptides that regulate the activation or inhibition of neurons that induced behaviors of appetite and satiety, resulting in hyperphagia after treatment.

Objetives. Analyze the short-term effect of the PON in the hypothalamus and adipose tissue transcriptome. Particularly analyze metabolic pathways related to the regulation of the processes of hunger, satiety and inflammation.

Materials and methods. Overnutrition model in Wistar rats by overlactation from day 3 to day 21 of life by litter size reduction method using pup male was generated; control (n = 5) and overnutrition (n = 5). Transcriptome was analyzed by microarrays of expression technology (Ratgene ST 2.2, Affymetrix®), with a coverage of 28,407 transcripts. The pathway analysis was performed with the Ingenuity Pathway Analysis software (IPA). Bioinformatic analysis was performed on the R statistical software, statistical analysis for phenotypic and biochemical parameters were analyzed in Graphpad Prism 6® software was applied Student t with $p < 0.05$.

Results. The data obtained shows overweight in treatment group, also high concentration of triglycerides and glucose serum, but cholesterol levels unchanged between. Transcriptome analysis in hypothalamus showed 226 deregulated transcripts of which 98 are under-expressed transcripts and 128 overexpressed with a cutoff of fold change (Log fold change) of 1.5 were found. Furthermore the adipose tissue transcriptome showed 161 deregulated transcripts of which 61 are overexpressed and 100 with underexpression. In hypothalamus vías analysis showed alterations in inflammation, circadian rhythms and leptin resistance. The deregulated vías in adipose tissue was associated to inflammation, disorder of lipid metabolism and hyperleptinemia.

Conclusion. Early postnatal overnutrition generates insulin resistance and dyslipidemia. We show for the first time the effects of early postnatal overnutrition in the hypothalamus and adipose tissue transcriptomes to 21 days. Some of differentially expressed transcripts controls neuronal circuits involving the hypothalamus control circadian rhythms and endocrine regulation (leptin vías), this is an evidence of metabolic disruption in hypothalamus and adipose tissue.

Introducción

Actualmente las enfermedades metabólicas presentan una prevalencia elevada con respecto a décadas anteriores. Éstas enfermedades como la resistencia a la insulina, dislipidemia u obesidad, aunado a un estilo de vida sedentario, consumo de alimento hipercalórico y alteraciones genéticas las cuales promueven el desarrollo y la progresión de enfermedades complejas como el síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), hipertensión arterial y aterosclerosis [1, 2]. Los padecimientos y enfermedades mencionadas disminuyen la calidad de vida y generan un problema de salud pública que capta una buena parte del presupuesto del sector salud en nuestro país. La presencia de dichos trastornos tienen como consecuencia principal el desarrollo de enfermedades vasculares oclusivas que tienden a comprometer la fisiología del sistema circulatorio y la vida de quienes las padece [3].

En los últimos años se ha reportado una relación entre alteraciones en hipotálamo y el tejido adiposo con los padecimientos metabólicos ligados a la dieta y el sedentarismo, principalmente por desordenes conductuales asociados a hiperfagia y desordenes endócrinos [4]. El tejido adiposo y el hipotálamo son estructuras consideradas como reguladores maestros de la homeostasis energética, que incluyen la regulación del apetito y la saciedad, donde radica su principal rol [5-11]. La perturbación en estos órganos derivados de estímulos exógenos puede provocar el desarrollo de enfermedades metabólicas. Entre los factores primarios que alteran estos tejidos se encuentran los estilos de vida obesogénico-sedentarios y los polimorfismos en genes relacionados a las rutas metabólicas de carbohidratos y lípidos [12].

El sistema nervioso central es el centro de regulación y la red de comunicaciones del organismo. En los humanos el hipotálamo presenta esencialmente tres funciones integrales: a) sensorial, b) motora y c) conductual [13]. La primera

función es conjuntar y evaluar, la información aferente y eferente del organismo con lo que se genera nueva información del entorno, de esta manera, se detecta las condiciones del propio cuerpo y del medio externo [12]. La segunda función es de respuesta y se deriva de la evaluación de la información percibida, de tal forma que, se genera una respuesta en forma de movimientos o secreciones glandulares. En tercer lugar, la función conductual es principalmente dirigida por el hipotálamo (como la conducta sexual y conductas de estrés) [14].

Hipotálamo

El cerebro es un órgano muy importante en la regulación de metabolismo y del peso corporal. Una región neuroanatómica crucial en la homeostasis es el hipotálamo. Éste se sitúa en el diencefalo que recibe información del tallo cerebral, dicha información proviene de vías aferentes del medio externo por medio de los órganos sensoriales como el gusto, oído, olfato, sensaciones somáticas, incluso impulsos viscerales. Las funciones principales del hipotálamo son: regulación e integración de información del sistema nervioso autónomo mediante impulsos sensoriales, conducta, temperatura corporal, pH sanguíneo, apetito y saciedad [15].

Estructura y función del hipotálamo

El hipotálamo presenta diferentes tipos celulares como tanicitos, células endodimales, astrocitos, oligodendrocitos, células de la microglía y diferentes fenotipos de neuronas. La estructura del hipotálamo se divide en tres regiones las cuales son anterior, tuberal y posterior, estas están compuestas de la siguiente manera:

Anterior: Núcleo preóptico medio, núcleo supraquiasmático, núcleo paraventricular, núcleo hipotalámico anterior y núcleo supraóptico. Las principales funciones reguladas por esta zona son el crecimiento, dimorfismo sexual, ciclos circadianos, sed y dolor. Además, se liberan en estos núcleos vasopresina,

oxitocina, GnRH, hormona liberadora de tirotrópina, hormona liberadora de corticotropina y somatostatina.

- Tuberal: Núcleo dorsomedial, núcleo ventromedial, núcleo arqueado, núcleo lateral y núcleo latero-tuberal. Estos núcleos regulan la saciedad, presión sanguínea, ritmos circadianos, hambre, inhibición de prolactina medida por dopamina y liberación primaria de orexinas.
- Posterior: núcleos mamilarios, núcleo posterior, núcleo lateral y tuberomamilar. las funciones relacionadas a estos núcleos son: memoria, dilatación de pupilas, despertar, estado de alerta, aprendizaje y sueño.

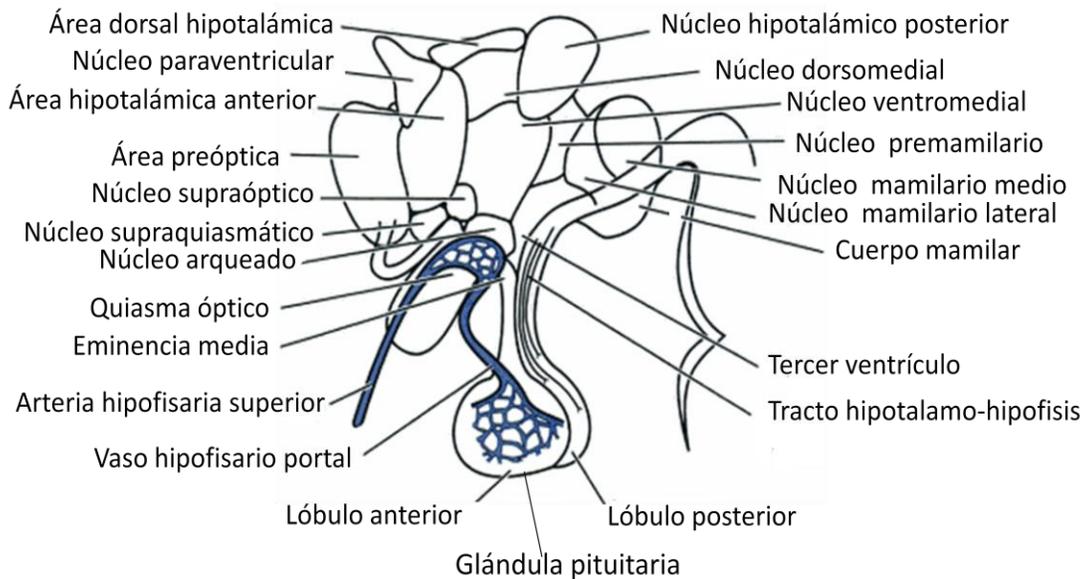


Figura 1. Esquema general del hipotálamo humano tomado de Rhodes [16]

En general el tejido hipotalámico presenta diversas regiones importantes que se comunican con la hipófisis y otras estructuras cerebrales, por ejemplo el núcleo paraventricular contiene neuronas que producen la liberación de hormonas a neuronas motoras simpáticas o parasimpáticas del tronco cerebral. Otras regiones como la zona lateral del hipotálamo y el núcleo dorsomedial contienen

interconexiones de neuronas de diferentes zonas cerebrales incluyendo el mismo hipotálamo y corteza cerebral [11].

La información de entrada al hipotálamo se da a través de órganos sensoriales y es analizada en el núcleo supraquiasmático, el cual promueve liberación de hormonas que estimulan a los tejidos para cumplir necesidades fisiológicas requeridas en periodos de noche y día. En este sentido, la interconexión neuronal permite la modulación y respuesta a partir de información sensorial aferente periférica. Lo anterior muestra que la respuesta diferencial entre los núcleos hipotalámicos permite llevar a cabo las tareas para mantener la homeostasis [17].

Otra forma por la cual el hipotálamo recibe información es a través de la barrera hematoencefálica. Esto es debido a que en dicha barrera en la zona de la eminencia media presentan fenestraciones en el endotelio, lo que permite un menor filtro para sustancias provenientes de la sangre periférica. Un núcleo hipotalámico cercano es el núcleo arqueado el cual regula las conductas de hambre y saciedad, además, las neuronas de este núcleo presentan receptores a un gran número de moléculas como citocina, leptina, triglicéridos, glucosa y adiponectina [13].

Estructura y función del tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco está compuesto por adipocitos, preadipocitos, células endoteliales, fibroblastos, macrófagos, linfocitos y células mesenquimales principalmente. Este conjunto celular está envuelto en una matriz de fibras de colágenas y elastina. Los adipocitos se caracterizan por que contienen depósitos de lípidos de forma unilocular que empujan al núcleo celular y otros componentes del citoplasma hacia una orilla de la membrana celular. La masa del tejido adiposo es muy variable entre individuos y conforma entre el 5% y 60% de la masa total corporal de un individuo. El tejido adiposo blanco se encuentra distribuido en depósitos subcutáneos y depósitos viscerales. Los depósitos subcutáneos se

encuentran en la región abdominal, femoral y del glúteo, mientras que, los depósitos viscerales se encuentran en la región abdominal, omental y mesentérica. El tejido adiposo subcutáneo representa ~80% del tejido adiposo total, sin embargo, el tejido adiposo visceral representa una carga de riesgo metabólico, a diferencia del tejido subcutáneo se considera relativamente benigno [18].

El tejido adiposo blanco regula el flujo de triglicéridos en periodos postprandiales y de ayuno. Así también, produce adipocinas que son señales endócrinas con importante función sistémica, por ejemplo, leptina, adiponectina, resistina, TNF- α , interleucina 6, 10, y 18 principalmente.

El tejido adiposo deriva del tejido conectivo areolar laxo y su unidad fundamental son los adipocitos, estos son células que se especializan en el almacenamiento y disponibilidad de lípidos corporales. Existen tres tipos de tejido adiposo marrón y blanco. El tejido adiposo blanco representa la unidad fisiológica del tejido, mientras que el tejido pardo se restringe principalmente al estado neonatal y el tejido beige se considera facultativo por su capacidad de transformarse de tejido adiposo blanco en tejido adiposo. El tejido adiposo marrón debe su color a un número elevado de mitocondrias y su función principal es la de generar calor. El tejido adiposo está compuesto por preadipocitos, adipocitos, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y leucocitos; la producción de sustancias efectoras y moduladoras le confiere al tejido un importante rol en el control del metabolismo [18].

Con el descubrimiento de la leptina, el interés en la investigación del tejido adiposo se incrementó de tal forma que hoy en día se conocen múltiples sustancias secretadas por las células del tejido que influyen en diversos procesos como la regulación del apetito, la regulación de la respuesta inflamatoria, regulación de termogénesis y de la sensibilidad a la insulina a través de la interacción con otros tejidos. Estas sustancias mediadoras producidas por el tejido adiposo son

denominadas adipocinas las cuales son consideradas “hormonas” debido a su efecto en otros tejidos. Entre las adipocinas más estudiadas se encuentran la adiponectina, leptina, resistina, visfatina, apelina, vaspina, heptacidina, factor de necrosis tumoral, quimerina, omentina, proteína quimio atrayente de monocitos y proteína activadora de plasminógeno [19, 20].

A través del depósito de lípidos los mamíferos aseguran una fuente de energía en situaciones ambientales adversas mediante la liberación de los ácidos grasos. Este proceso es modulado por la comunicación compleja entre el hipotálamo y el tejido adiposo que forma una red de señalizaciones que depende de los efectos de las adipocinas y los ácidos grasos liberados por el tejido adiposo sobre el hipotálamo, además de la información aferente de órganos sensoriales.

Las adipocinas, ácidos grasos e información de órganos sensoriales entrante es captada por un grupo de neuronas orexigénicas (NPY/agRP) y neuronas anorexigénicas (POMC) pertenecientes al núcleo arqueado hipotalámico, lo que modula la ingesta de alimento, mediante el nervio vago y otros nervios simpáticos [8].

Comunicación entre hipotálamo y tejido adiposo

La comunicación entre estos tejidos es importante debido a los procesos energéticos que ambos tejidos regulan. Para dicha comunicación es necesaria la interacción de múltiples neuropéptidos orexigénicos como el neuropéptido Y, la proteína agouti, así también, los anorexigénicos como pro-opiomelacortina, el transcrito regulado por anfetaminas, la cocaína, y ghrelina. En este sentido, existen otras moléculas reguladoras como las hormonas secretadas por el tejido adiposo de las cuales la leptina, TNF- α e interleucinas generan comunicación directa con el hipotálamo. Debido a estas sustancias efectoras, el tejido adiposo es biológicamente activo y engloba un amplio rango de funciones endócrinas y metabólicas. Además los ácidos grasos liberados por los adipocitos brindan la

principal fuente de energía en el ayuno, lo que mantiene equilibrio de sustratos energéticos [8].

Los efectos del eje hipotálamo-tejido adiposo son pleiotrópicos en tejido muscular, adiposo, endotelio, músculo cardíaco, músculo visceral, tejido neuronal y hepático. Sin embargo, la desregulación en este eje provoca alteraciones que afectan rutas metabólicas como gluconeogénesis, glucogenogénesis, glucólisis, lipólisis y β -oxidación. Una posible causa se debe a alteraciones de moléculas clave, tal es el caso de la cinasa de adenosina monofosfato (AMPK por su siglas en inglés) la cual controla la homeostasis energética en todas las células. Sin embargo no se conocen a detalle todos los mecanismos involucrados en su desregulación, en particular el efecto de la sobrenutrición temprana [21].

En los últimos 10 años se ha descrito la inervación del sistema nervioso simpático y parasimpático sobre el parénquima del tejido adiposo de tipo preganglionar. Otros trabajos reportan la inervación parasimpática. Recientemente se ha reportado actividad simpática en el tejido adiposo en respuesta a la privación de alimento [12].

Hiperfagia

La hiperfagia es considerada una conducta caracterizada por el incremento en el consumo de alimento, lo que conlleva generalmente a desarrollar obesidad, dislipidemia, presión arterial elevada y resistencia a la insulina de forma persistente en edad adulta. Se piensa que la hiperfagia es una alteración central e iniciadora de enfermedades metabólicas. A su vez, la persistencia de estas enfermedades metabólicas generan estrés celular como la lipotoxicidad, glucotoxicidad, estrés oxidativo y estrés del retículo endoplásmico (en diferentes tejidos) los cuales son estrechamente relacionados con la generación de enfermedades crónico degenerativas que disminuyen la calidad de vida y

aumentan el riesgo cardiovascular como el síndrome metabólico, DMT2 y aterosclerosis [22, 23].

Sobrenutrición

La sobrenutrición hipercalórica está altamente asociada con alteraciones en hipotálamo y tejido adiposo debido a un exceso en el aporte de macronutrientes energéticos. El exceso de ingesta puede conllevar a generar obesidad y alteraciones metabólicas. A su vez dichas alteraciones en los tejidos anteriormente mencionados han sido reportadas en enfermedades crónicas degenerativas como la dislipidemia, la resistencia a la leptina e insulina [2, 23-26].

La obesidad infantil se encuentra relacionada con la sobrenutrición hipercalórica en etapa de lactancia y consumo de leche de fórmula, aunque no se encuentra bien documentada las características de la sobrenutrición en etapa de lactancia y tampoco sus efectos a corto y largo plazo [2, 23-26].

Programación metabólica

La programación metabólica es la respuesta celular a un ambiente adverso que establece en el organismo en un tiempo relativamente mediano o largo. Por ejemplo, la programación fetal (relacionada con enfermedades metabólicas) es la respuesta fisiológica a un ambiente intrauterino y ésta respuesta puede permanecer hasta la vida adulta. Sin embargo, la programación metabólica establecida en la etapa fetal aumenta la probabilidad de que un individuo genere en la vida adulta enfermedades crónicas degenerativas que disminuyen la calidad y esperanza de vida para el individuo. Los mecanismos por los cuales se genera una programación metabólica son principalmente de carácter epigenético y no han sido bien caracterizados [4].

Antecedentes

- En 2003 Se reportó alteraciones metabólicas en niños alimentados por madres obesas [27].
- En 2013 se estudió en un grupo piloto de niños con obesidad edad preescolar de acuerdo a sus características metabólicas los predisponen a padecer enfermedades crónicas [28].
- En 2013 se describen distintos trastornos metabólicos asociados a daño en diferentes órganos (tejido adiposo, corazón, riñón, hígado, hipotálamo, etc) en un modelo de sobrenutrición con rata Wistar [29].
- En 2014 se estudió el daño a largo plazo generado por una sobrenutrición temprana en ratas Wistar [30].
- Por último, en 2015 se reportó el efecto de las sobrenutrición temprana en el perfil de lípidos y resistencia a la insulina similares a síndrome metabólico [31].

Objetivos

Objetivo General

- Evaluar el efecto a corto plazo de la sobrenutrición temprana en el transcriptoma de hipotálamo y tejido adiposo en ratas Wistar macho.

Objetivos particulares

- Comparar los cambios bioquímicos y fenotípicos a corto plazo inducidos por la sobrenutrición temprana en ratas Wistar.
- Identificar diferencias de expresión genómica inducidas por la sobrenutrición temprana en hipotálamo y tejido adiposo en ratas Wistar.
- Distinguir mediante herramientas bioinformáticas las rutas metabólicas desreguladas.

Justificación y planteamiento del problema.

La alteración del tejido adiposo e hipotálamo pueden provocar desordenes endócrinos y generan conductas de hiperfagia. Actualmente alteraciones como el síndrome metabólico y la DMT2 han sido asociadas fuertemente con un elevado consumo de alimento hipercalórico. México tiene una prevalencias más elevada de obesidad, DMT2 y enfermedades cardiovasculares en niños y adultos en comparación al resto del mundo. Por otro lado las enfermedades vasculares y sus complicaciones comprometen la calidad de vida y aumentan la mortalidad generando un importante problema de salud para el país. Por tanto, el presente trabajo pretende indagar los efectos de una sobrenutrición en etapas tempranas del desarrollo.

Hipótesis

La sobrenutrición temprana genera hiperfagia y obesidad a corto plazo. La respuesta sistémica a dicho estímulo genera alteraciones en la bioquímica sanguínea y diversos tejidos del organismo. Dicha respuesta está orquestada por el transcriptoma del hipotálamo y tejido adiposo a corto plazo. Los cambios en el transcriptoma de dichos tejidos durante la sobrenutrición temprana se generan en vías metabólicas energéticas, respuesta inmunológica, proliferación y neurofisiológicas (hipotálamo).

Metodología

Modelo animal

Para estudiar los efectos de la sobrenutrición temprana se utilizó el modelo experimental de “sobrenutrición postnatal mediante reducción de crías”, el cual fue revisado y aceptado por el Comité de Ética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV sede sur), con el número de protocolo 461. La manipulación de animales se llevo a cabo de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999. Para llevar a cabo el tratamiento de sobrenutrición y generar un estudio de contraste, se generaron 2 grupos de ratas Wistar, el primero con sobrenutrición y el segundo fue un grupo control. Para generar el grupo de sobrenutrición se redujo el número de camada a 4 crías macho por camada en el día 3 de vida. Para generar el grupo control, las camadas se estandarizan a un número de 10 crías por camada. El tratamiento duró hasta el día 21 de vida de las crías y posteriormente fueron sacrificadas por el procedimiento de decapitación, el cual facilita la obtención de sangre [32, 33].

Obtención de sangre periférica y suero

Tras la decapitación se colectó la sangre total de los vasos seccionados en el cuello en un tubo para centrífuga. Después de unos minutos se formó un coágulo en el tubo que fue removido lentamente y se centrifugó con una microcentrífuga Eppendorf® a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

Obtención de tejidos y almacenamiento de muestras biológicas

Se procedió a la obtención del hipotálamo y el tejido adiposo mediante extracción quirúrgica, inmediatamente se pesaron los tejidos en cuestión, se colocaron dentro de tubos para microcentrífuga y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido el tiempo de duración de cada sacrificio fue de entre 6 y 9 minutos. Las muestras biológicas fueron almacenadas posteriormente a -80°C hasta el procedimiento de extracción de RNA.

El suero obtenido junto con las muestras también se almacenó en microtubos de polipropileno de 600 microlitros con etiquetas específicas respectivamente,

congeladas en nitrógeno líquido y los tubos se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Posteriormente se utilizó una fracción del suero para cuantificar triglicéridos, colesterol total, glucosa y leptina, mientras que, los tejidos hipotálamo y tejido adiposo fueron tratados con Trizol® para extraer el ARN genómico de alta calidad.

Extracción de ARN

La extracción de ARN se obtuvo con el reactivo de Trizol® (Invitrogen) que permite extraer y purificar ARN genómico a partir de tejido sólido. Este método se basa en la desnaturalización de proteínas facilitando la lisis celular mecánica y mantiene estable el ARN, siguiendo los siguientes pasos.

1. Homogenización. Se agregó ~100 mg de tejido adiposo o hipotálamo en 1 ml de trizol y se homogenizó el tejido con un politrón® (se trabajó sobre hielo).

Se agregaron 200µl de cloroformo a la mezcla y se homogenizó suavemente con la mano.

La mezcla fue centrifugada a 12000 g durante 15 minutos a 4°C .

Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo (fase acuosa).

Posteriormente se agregaron 500 µl de isopropanol (-20°C). La mezcla se incubó 10 minutos, y se precipitó toda la noche a -20°C .

2. Lavado. Se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4°C .
Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de alcohol al 75%.
Se centrifugó la mezcla a 7500 g durante 10 minutos a 4°C . Se repitió este paso 2 veces y el último lavado se utilizó alcohol absoluto.
3. Resuspensión. La pastilla obtenida en el último lavado se dejó secar (no completamente).
La pastilla parcialmente seca se resuspendió en agua libre de ARNsas.
Se colocó la muestra en baño maría durante 5 minutos.

Las muestras fue analizada para determinar su concentración y pureza en un espectrofotómetro NanoDrop® ND 1000 [34, 35].

Nota: Se realizó un segundo análisis de calidad obteniendo como calificación el número de integridad del ARN y generando un análisis en Agilent® 2100 Expert bioanalizador, este analizador examina la presencia de las fracciones de ARN ribosomal.

Ensayo de hibridación de microarreglos

Este procedimiento se llevó a cabo en la Unidad de Expresión del INMEGEN.

Esquema del ensayo de marcaje de blancos de la cadena sentido de transcritos totales utilizando un GeneChip® Rat Gene 2.0 ST Array de Affymetrix® con capacidad de analizar 28 407 transcritos [36].

1. Adición de poli A. Se adicionaron colas de poli A en los extremos 3' de todos los transcritos. Además se adicionaron 4 controles de transcritos específicos a 4 concentraciones (estos transcritos pertenecen a distintos organismos).
2. Síntesis y amplificación de todos los transcritos para generar cADN. Primeramente se realizó un primer ciclo de síntesis de la primera cadena de cADN, para ello se agregaron cebadores asociados con el promotor T7 (2 horas).

Se generó un primer ciclo de síntesis de cADN de la segunda cadena (2.5 horas).

Se generó un primer ciclo *in vitro* de transcripción del cADN con nucleótidos no marcados para generar cARN (toda la noche).

3. Limpieza de las muestras. Se realizó limpieza de la cadena antisentido de ARN o cARN (10 minutos).
4. Síntesis y amplificación de todos los transcritos para generar cADN. Se realizó un segundo ciclo de síntesis de la primera cadena de cADN, para ello se agregaron cebadores aleatorios dUTP (2 horas).

Posteriormente se llevó a cabo hidrólisis del cARN (1 hora).

5. Limpieza de las muestras. Se realizó limpieza de la cadena sentido de ADN mediante la adición de ARNsa H (10 minutos).
6. Marcaje terminal de todos los transcritos. Se fragmentaron las cadenas de ADN generando oligonucleótidos de 25 nucleótidos en promedio mediante la adición del complejo enzimático UDG/APE1 (1.5 horas), el cual, fragmenta y marca el ADN en un solo paso, usando una ADN glicosilasa uracilo, una endonucleasa apurinica / apirimidinica para marcaje (1.5 horas, tiempo de experimento) el ADN se utilizó una transferasa terminal que une una biotina al extremo terminal (US 20070218478 A1).
7. Hibridación. La hibridación se realizó vertiendo los fragmentos marcados de ADN sobre la placa de sílice de los microarreglos, junto con controles de hibridación, utilizando Genechip® Hybridization Oven 645 (16 horas).
8. Lavado y tinción de fragmentos marcados. Se agregaron 2 mezclas de reactivos para generar un complejo biotina-estreptavidina y posteriormente ser detectado por anticuerpos terciarios marcados con un fluoróforo (1.5 horas).

9. Escaneo. El escaneo se realizó mediante la detección de fluorescencia de la placa del microarreglo con un Genechip®Scanner 3000 7G (10-30 minutos).

Análisis de datos de la expresión genómica

Para este análisis se utilizaron las mediciones de las intensidades obtenidas del escaneo de los microarreglos ordenadas en un archivo de extensión “.CEL” (Estos archivos contienen datos de las sondas hibridadas del micro arreglo de expresión). Para la lectura de este archivo se utilizó el software “R” usando el paquete “Oligobridados”. Se generaron histogramas de frecuencias que representan las distribuciones de las intensidades emitidas por la hibridación de cada grupo de sondas, además se realizaron gráficas de bigotes para representar las distribuciones de frecuencias de éstas intensidades de cada arreglo. Para poder hacer un análisis comparativo se realizó una corrección de fondo y una normalización de datos a través del promedio de multiarreglos robusto (o RMA del inglés robust multi-array average). Para la corrección de fondo se utilizaron valores de sondas perfectamente hibridadas (PM o perfect match). La normalización de datos fue realizada a través de cuantiles, La estimación de intensidades se realizó con un análisis de la mediana o cuantiles (*median polish*). Posteriormente se realizó un histograma y una gráfica de bigotes para analizar los datos normalizados.

Posteriormente con el paquete “limma” de bioconductor se realizaron análisis estadísticos (análisis bayesiano y *t* de student). Los análisis estadísticos fueron basados en una matriz de contraste experimental (grupo de sobrenutrición vs grupo control). Conforme a los promedios de intensidades para cada transcrito se generó el logaritmo base 2 del valor de cambio de expresión ó “log fold change” (log fch). Se realizó una gráfica de volcán para representar diferencias en los transcritos por *valor p* y log fch.

Para determinar los transcritos diferencialmente expresados se fijó como puntos de corte aquellos que presentaba un $\log_2 \text{fch} > 1.5$ y un valor $p < 0.05$, en el caso del tejido de hipotálamo, y para el caso del tejido adiposo el punto de corte fijado fue $\log_2 \text{fch} > 2.0$ y un valor $p < 0.05$. Las listas generadas fueron representadas en graficas de tipo mapas de calor realizadas con el paquete “gplots” [37, 38].

Análisis de vías metabólicas

El análisis de vías metabólicas se realizó con el programa IPA® (Ingenuity Pathway Analysis). Para este análisis se utilizó la lista de transcritos diferencialmente expresados, $\log_2 \text{fch}$ y valor p . El programa se basa en la asociación de función para cada transcrito, el número de transcritos relacionados en una vía y la relación entre los transcritos.

Resultados

Peso corporal, órganos y tejidos

Se obtuvieron 5 camadas control y 7 camadas tratamiento a 21 días. Se seleccionaron 4 machos de cada camada control y tratamiento. Fueron sacrificados por decapitación a los 21 días de vida con un ayuno de 5 horas. Se extrajo el hipotálamo y el tejido adiposo de forma quirúrgica entre los primeros 5 minutos después de la decapitación.

Se realizaron 4 registros de peso corporal de las camadas de los grupos experimentales a los 3, 7, 14 y 21 días (Figura 2). Los resultados de peso obtenidos de la comparación de los grupos control y tratamiento peso, muestran diferencia estadística en el día 7, 14 y 21. El grupo tratado muestra la mayor diferencia de peso al día 21 con un incremento en el peso de 183.2 % con una $p < 0.0001$ utilizando la prueba de t de Student. En el estudio se incluyeron 5 camadas control (50 ratas macho) y 5 camadas tratamiento (20 ratas macho).

Para evaluar el peso de los órganos en el tratamiento, se registró el peso los siguientes órganos y tejidos: cerebro, hígado, corazón, riñón, tejido adiposo y tejido hipotálmico. Los resultados muestran incremento significativo ($p=0.0001$) en el peso de todos los tejidos excepto en tejido hipotalámico como lo muestran las Figuras 2, 3 y 4. El hígado, riñón y corazón en el grupo de sobrenutrición presentaron el doble de peso en comparación con los controles. El tejido adiposo en el grupo de sobrenutrición tuvo un aumento significativo del 300% con respecto al control como se muestra en la Figura 4.

En cuanto al análisis del valor porcentual (Figura 6) de los tejidos y órganos con respecto al peso corporal muestran un menor peso el cerebro, el hipotálamo y corazón, mientras que, el hígado, tejido adiposo y riñón presentan un mayor valor porcentual de peso. Siendo el tejido adiposo y el hipotálamo muestran alteración en la relación porcentual de peso.

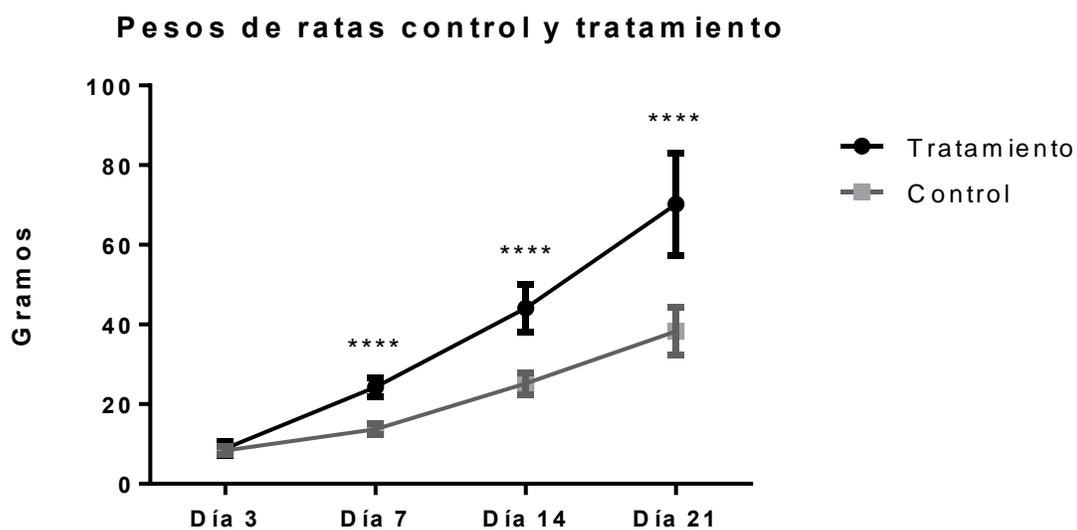


Figura 2. Peso corporal de las camadas control (50 ratas pertenecientes a 5 camadas) y camadas tratamiento (20 ratas macho pertenecientes a 5 camadas). Se realizó una prueba de *t* de *Student*, **** = $p < 0.0001$ y la barra de error representa la desviación estándar.

Figura 3. Peso en gramos de cerebro e hipotálamo de ratas control y con sobrelactación a 21 días. Se realizó la prueba t de *Student*, *** = $p < 0.001$, la barra de error representa la desviación estándar.

Figura 4. Peso en gramos de tejido adiposo e hígado de ratas control y con sobrelactación a 21 días. Se realizó la prueba t de *Student*, **** = $p < 0.0001$, la barra de error representa la desviación estándar.

Figura 5. Peso en gramos de corazón y riñón de ratas control y con sobrelactación a 21 días. Se realizó la prueba t de *Student*, **** = $p < 0.001$, la barra de error representa la desviación estándar.

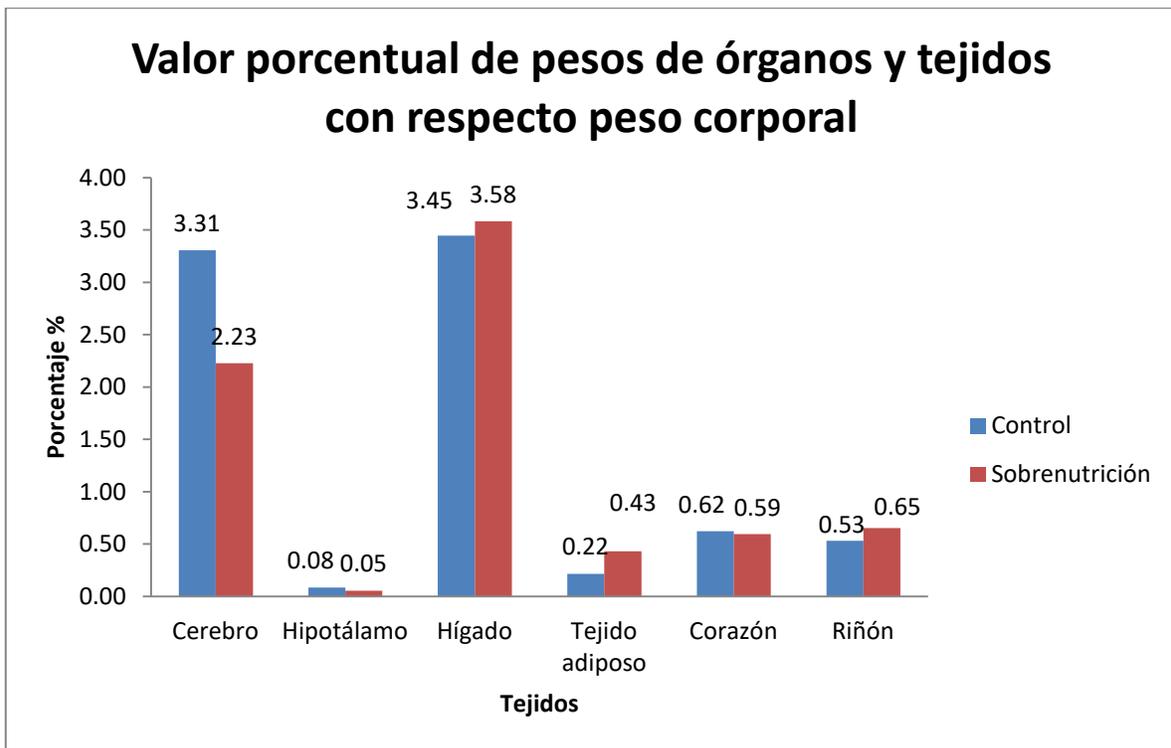


Figura 6. Valor porcentual de órganos y tejidos. La media del peso de cada tejido u órgano fue contrastado contra la media del peso corporal total de cada grupo.

Parámetros bioquímicos sanguíneos

Se analizaron en el suero de las ratas las concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol total mediante colorimetría, el análisis de leptina con el método de radio inmunoensayo. Todos estos parámetros fueron determinados en suero de ratas de ambos grupos de estudio en ayunas. El grupo de estudio de sobrenutrición mostró valores mayores en la concentración glucosa en suero con diferencia estadística significativa con respecto al control, mientras que, los valores de colesterol permanecieron sin cambio como muestra la Figura 7. El grupo de sobrenutrición también presentó mayor concentración de triglicéridos y leptina, los cuales fueron estadísticamente significativos como muestra la Figura 8. Se analizaron muestras de 5 camadas control y 5 camadas tratamiento no completas.

Figura 7. Concentración de leptina y colesterol en suero de ratas control y con sobrelactación a 21 días. Se realizó la prueba t de *Student*, * = $p < 0.05$, la barra de error representa la desviación estándar.

Figura 8. Concentración de leptina en suero de ratas control y con sobrelactación a 21 días. Se realizó la prueba t de *Student*, *** = $p < 0.001$, la barra de error representa la desviación estándar.

Expresión de transcriptoma de hipotálamo y tejido adiposo

Se obtuvo datos de hibridación pertenecientes a 20 microarreglos (GeneChip® Rat Gene 2.0 ST Array de Affymetrix®). Diez microarreglos se destinaron para analizar el transcriptoma del hipotálamo (la hibridación se realizó con 5 muestras control y 5 muestras sobrenutridas). Mientras que, los diez microarreglos restantes se destinaron para analizar el transcriptoma de tejido adiposo. Cada chip fue hibridado con cADN genómico perteneciente a una muestra única de tejido de cada animal que fue incluido en el estudio.

Se realizó un análisis lineal y de contraste con la prueba t de *Student* moderada entre los grupos control y sobrenutrición. Se obtuvo valor p (probabilidad de error) y log fch.

Para determinar los transcritos diferencialmente expresados en hipotálamo se utilizó el valor absoluto de $\log fch > 1.5$ y el valor $p < 0.05$ como criterios de selección. En tejido adiposo se utilizó el valor absoluto de $\log fch > 2.8$ y el valor $p < 0.05$ como criterios de selección, debido a una mejor agrupación de datos. Mediante estos criterios se elaboró gráficos de volcán (Figura 8 y 13), donde se representa la expresión de cada muestra. Además se pueden observar aquellos transcritos que pasan los criterios de selección, es decir, aquellos que tienen un valor p menor a 0.05 y un $\log fch > 1.5$.

Mediante la aplicación de los criterios de selección para el tejido hipotalámico se obtuvieron 226 transcritos diferencialmente expresados, los transcritos con mayores diferencias estadísticas se muestran en la Tabla 2. Noventa y ocho transcritos y 128 con sub expresión en el grupo de sobrenutrición con respecto al grupo control, como se muestra en las Figuras 7 y 8.

En el tejido adiposo se obtuvo 161 transcritos diferencialmente expresados, de los cuales 61 transcritos están sobre-expresados y 100 transcritos están sub-

expresados en el grupo de sobrenutrición con respecto al grupo control como muestran las Figuras 13 y 14.

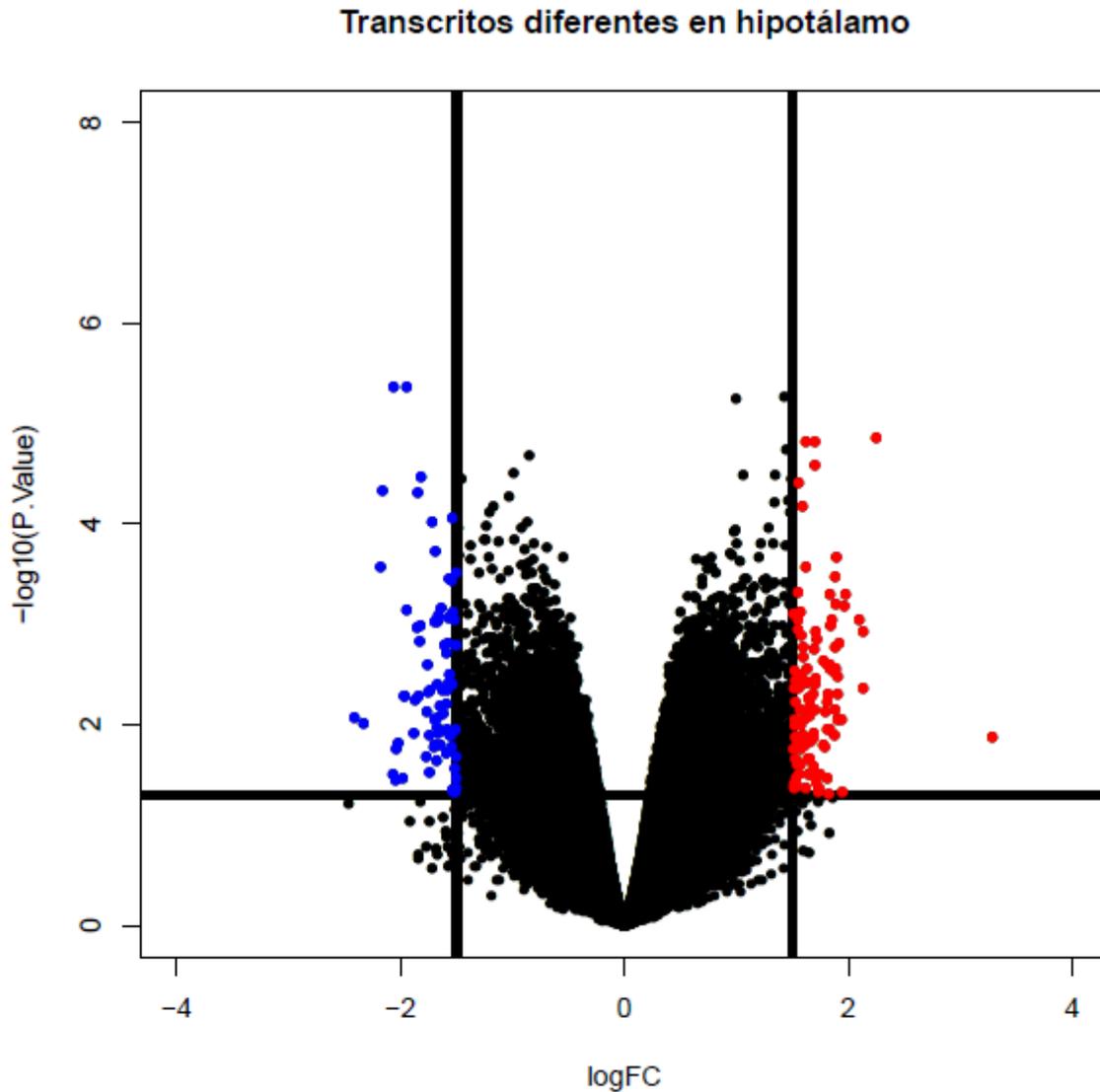


Figura 9. Gráfica de Volcán de hipotálamo muestra el valor de log fch en el eje “x” y en el eje “y” $-\log_{10}$ valor p de 28407 transcritos pertenecientes a 10 muestras hibridadas en cada microarreglos. La línea horizontal representa el punto de corte del valor $1.30103 = -\log_{10}(p < 0.05)$, mientras que las líneas verticales representan el punto de corte de log fch > 1.5 . La gráfica se realizó en el programa R-project con el paquete limma y gplots2.

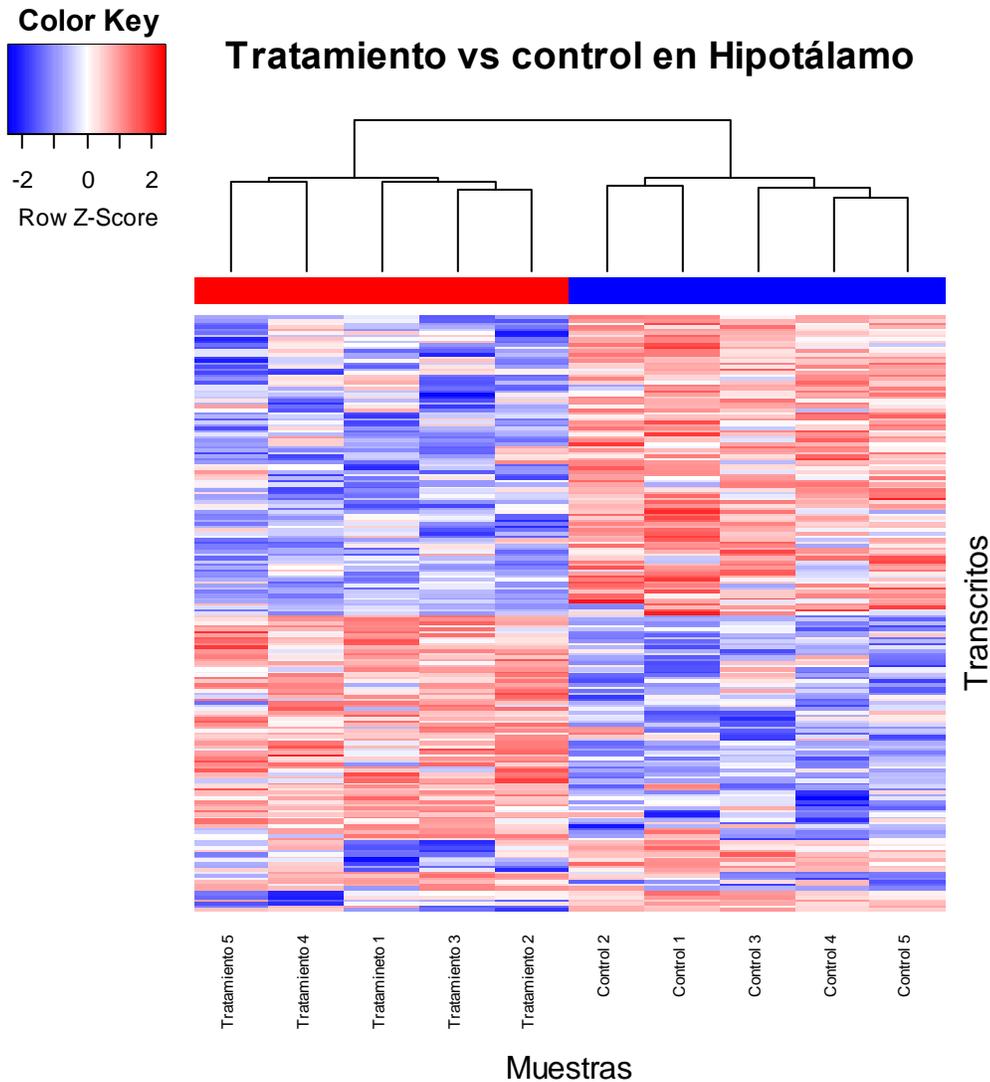


Figura 10. Mapa de calor de transcritos diferencialmente expresados en el hipotálamo entre los grupos sobrenutrición con respecto al control. En este mapa de calor se representa la diferencia de expresión entre los grupos de estudio, los valores de crudos de expresión son transformados a valores “Z” (donde $Z = \frac{X - \bar{X}}{S}$), a su vez estos valores son agrupados por distancia matemática. En este mapa de calor se representan 226 transcritos diferencialmente expresados, de los cuales 128 transcritos están sobre-expresados y 98 transcritos están sub-expresados en el grupo sobrenutrido con respecto al grupo control. La gráfica se realizó en el programa R-project con el paquete gplots2.

Tabla 1. Transcrito con mayores valores de $|\log fch|$.

Clave	Símbolo	Log fold change	Promedio de expresión	Valor "t"	Valor "p"	Valor "p" ajustado	Estadístico bayesiano
17684853	Cfh	3.283118	7.77606664	2.9524097	0.01336451	0.99936628	-3.95534043
17825570	Timeless	2.24633574	4.50392194	7.44105309	1.42E-05	0.48049112	-3.14374596
17624695	Kank1	2.13012443	8.23546558	3.59634671	0.00430392	0.99936628	-3.76119795
17864882	Mpp4	2.13000756	5.16981844	4.35649711	0.00118686	0.95520794	-3.57271457
17619950	Acsm5	2.09970603	4.78833495	4.51463924	0.00091606	0.95520794	-3.53878089
17820339	Birc6	-2.0672156	6.9282658	-2.45922204	0.03204594	0.99936628	-4.12314932
17632408	Mybpc2	-2.17777367	4.25789828	-5.28256002	0.00027365	0.89527243	-3.39664674
17776453	Spg11	-2.32738454	4.58792328	-3.11798336	0.00996491	0.99936628	-3.902467
17703141	LOC100912724	-2.40990022	4.65571613	-3.21254048	0.00843112	0.99936628	-3.87316298
17662438	Gh1	-2.46037378	7.75986769	-2.08155848	0.06193836	0.99936628	-4.25863934

Tabla 1. En esta tabla se muestran los cinco transcritos con mayor expresión diferencial (los transcritos con un valor de $\log fch$ positivo son transcritos sobre-expresados mientras que los valores negativos indican sub expresión respecto al grupo control). Los transcritos corresponden a genes que cuya función es la regulación de ritmos circadianos (*timeless*), sistema inmune (*cfh*), citoesqueleto (*Kank1*), proliferación (*Gh1*), etc. La Tabla es un fragmento del reporte la tabla general de resultados de expresión (o Top Table por su nombre en inglés) obtenido en con el programa R-project y el paquete limma.

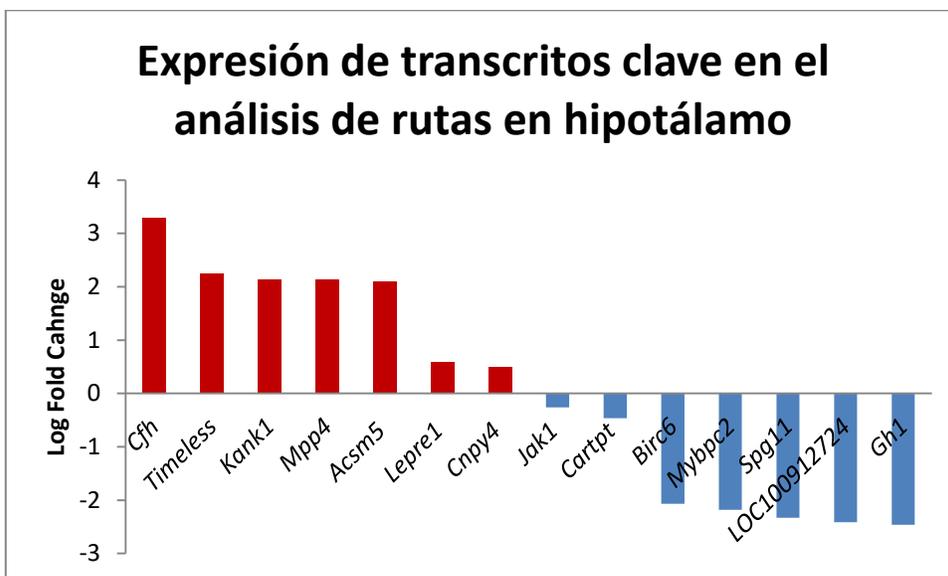


Figura 11. Representación gráfica de transcritos con función regulatoria de ritmo circadiano (*timeless*), apetito (*jack1* y *lepre1*), inflamación (*cnpy4*, *jack1*, *birc6*, etc) y proliferación (*gh1*). La gráfica se realizó con el programa Excel.

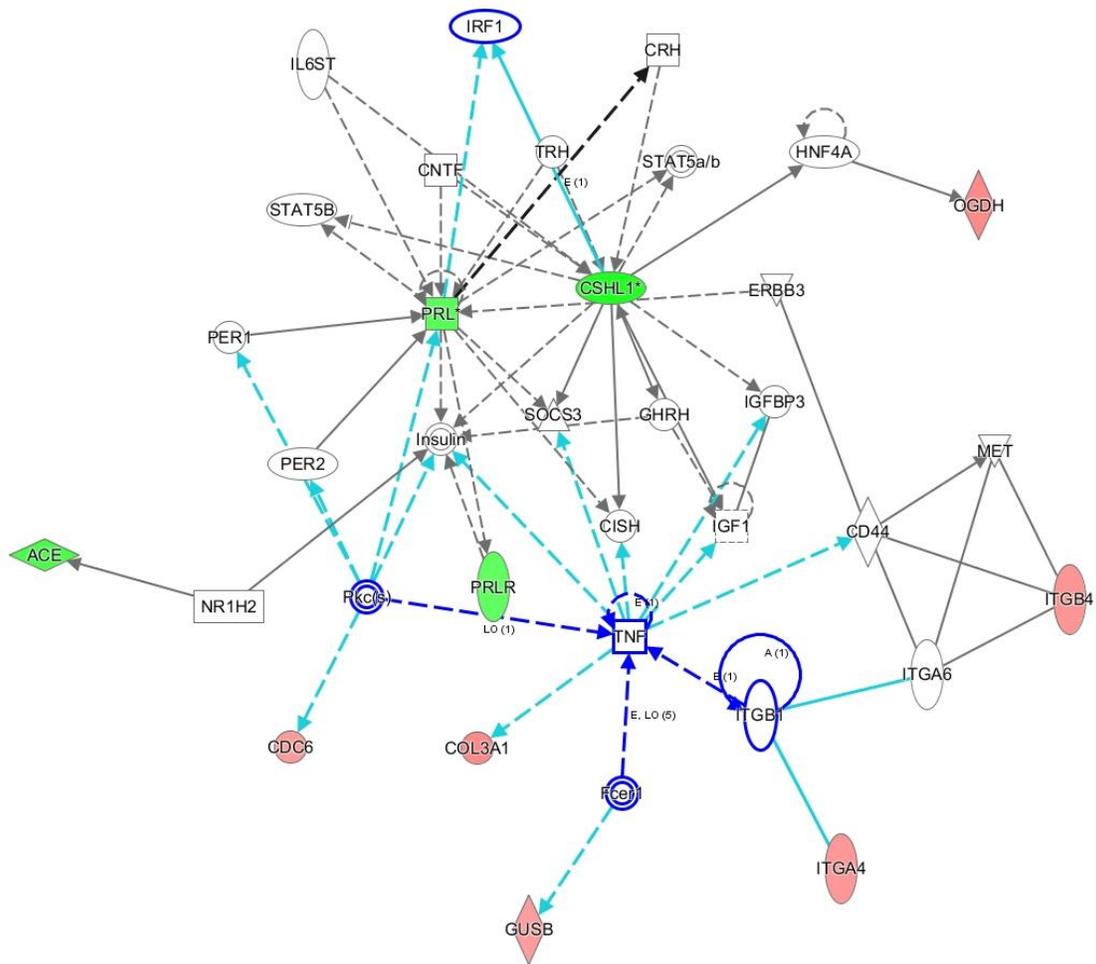


Figura 12. Red de interacción de hipotálamo. En esta Figura se muestra el resultado del análisis de redes metabólicas que muestra la interacción de las principales vías de señalización en donde se encuentran los transcritos sub-expresados y sobre-expresados. Entre las principales vías enriquecidas se encuentran las vías de inflamación, sistema de complemento, señalización de calcio, presentación y reconocimiento de antígenos. En cuanto a las rutas inhibidas se encuentran rutas asociadas a prolactina. El análisis se realizó en el programa IPA. Los criterios de selección para incluir los transcritos en el análisis fueron $|\log fch| > 1.5$ y $p < 0.05$.

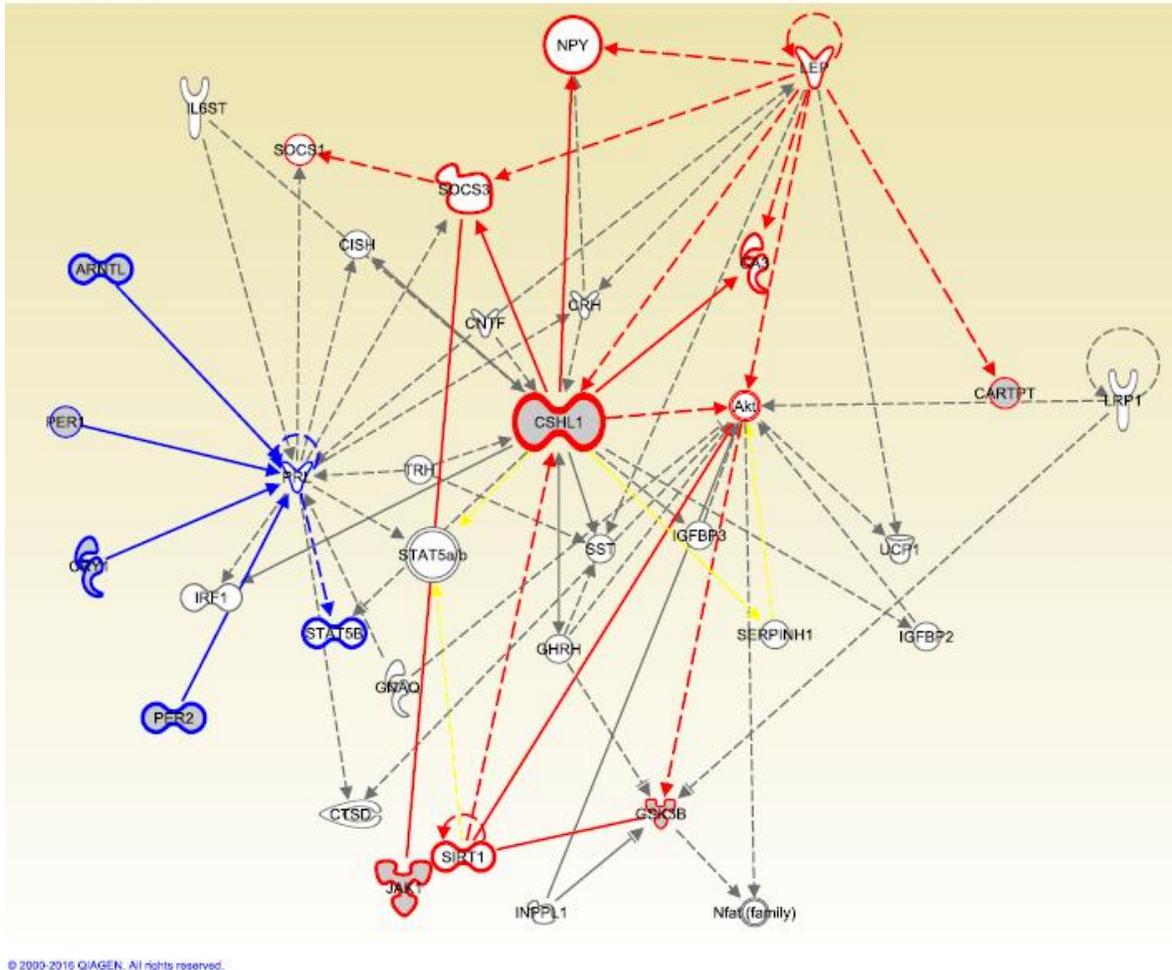
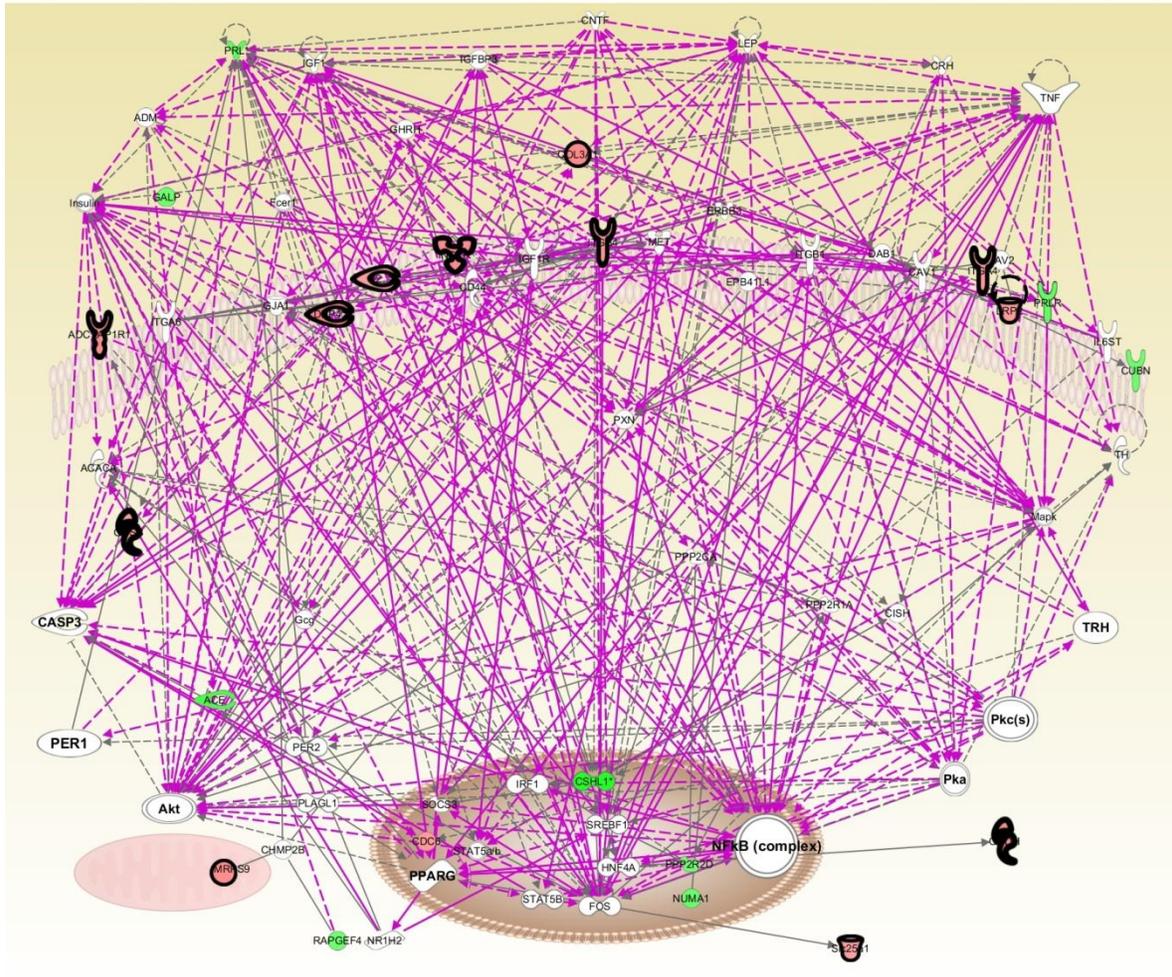


Figura 13. Análisis específico de la interacción entre las rutas de ritmos circadianos y resistencia a leptina en hipotálamo. Los resultados del análisis muestran alteración en estas vías de señalización. El análisis se realizó en el programa IPA. Los criterios de selección para incluir los transcritos en el análisis fueron $|\log fch| > 1.0$ y $p < 0.05$.



© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 14. Análisis global de vías de señalización alteradas en hipotálamo. Las funciones asociadas a estas vías son: inflamación, apetito, metabolismo energético, ritmo circadiano y regulación endócrina. Los transcritos sobreexpresados se encuentran en negrito con rojo, mientras que los transcritos subexpresados se encuentran en verde. El análisis se realizó en el programa IPA. Los criterios de selección para incluir los transcritos en el análisis fueron $|\log fch| > 1.5$ y $p < 0.05$.

Transcritos diferentes en TA

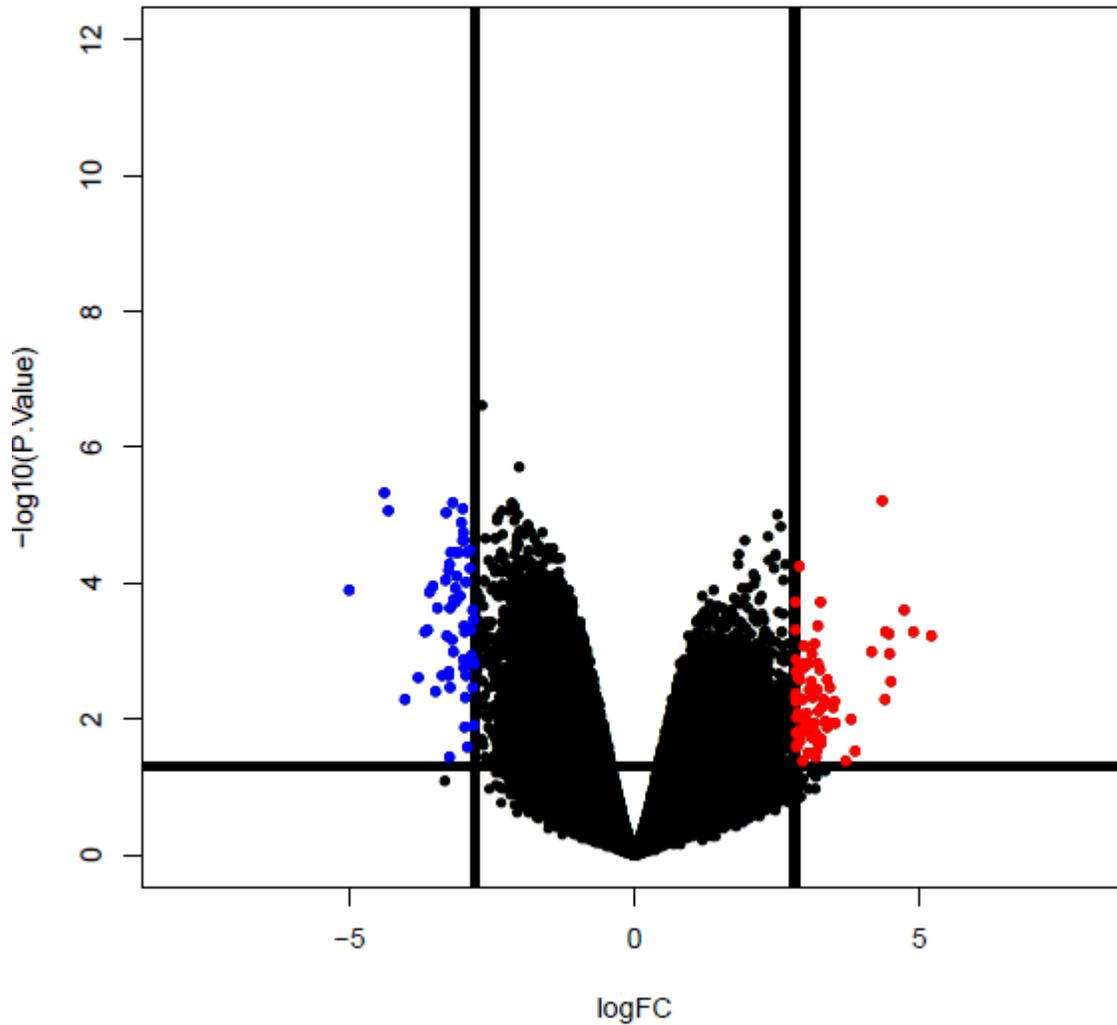
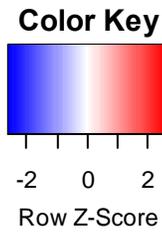


Figura 15. Gráfica de Volcán de expresión de tejido adiposo que muestra el valor de log fch en el eje "x" y en el eje "y" $-\log_{10}$ valor p de 28407 transcritos pertenecientes a 10 muestras hibridadas en cada microarreglos. La línea horizontal representa el punto de corte del valor $1.30103 = -\log_{10}(p < 0.05)$, mientras que, las líneas verticales representan el punto de corte de log fch > 2.8 . La gráfica se realizó en el programa R-project con el paquete limma y gplots2.



Tratamiento vs control en Tejido adiposo

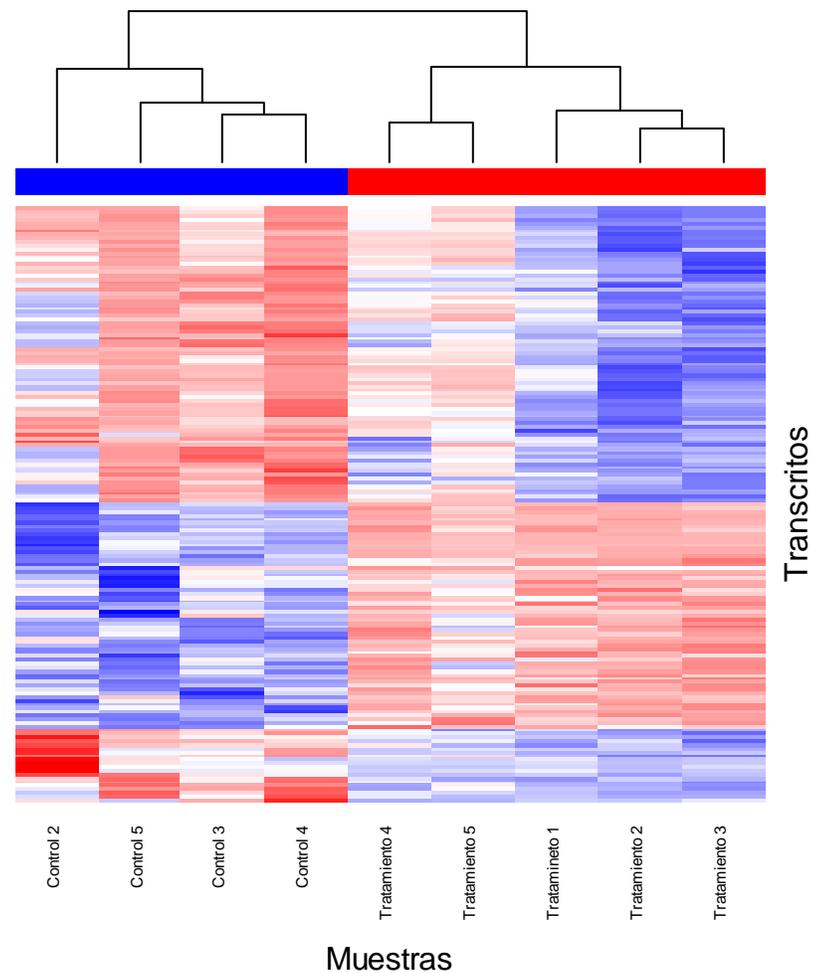


Figura 16. Mapa de calor de los transcritos diferencialmente expresados en tejido adipo entre los grupos sobrenutrici3n con respecto al control. En este mapa de calor se representa la diferencia de expresi3n entre los grupos de estudio, los valores crudos de expresi3n son transformados a valores "Z" (donde $Z = \frac{X - \bar{X}}{S}$), a su vez estos valores son agrupados por distancia matemática. En este mapa de calor se representan 161 transcritos diferencialmente de los cuales 61 transcritos est3n sobre-expresados y 100 transcritos est3n sub-expresados en el grupo sobrenutrido con respecto al grupo control. La gr3fica se realiz3 en el programa R-project con el paquete gplots2.

Clave	Símbolo	Log fold change	Promedio de expresión	Valor "t"	Valor "p"	Valor "p" ajustado	Estadístico bayesiano
17818079	Unc79	5.00320245	5.9038454	6.00391529	0.00013105	0.17281046	1.20074978
17818153	Serpina3n	4.39305046	9.33023086	8.85213641	4.78E-06	0.14313997	3.56829951
17730134	Hydin	4.31463425	5.26282014	8.26219631	8.83E-06	0.14313997	3.16787547
17832433	Scn8a	4.02440943	5.98836637	3.55966173	0.0051785	0.33540314	-1.88725492
17756764	RT1-Db1	3.80196531	6.97801158	3.99610162	0.0025307	0.28265487	-1.26194993
17874431	Arhgap36	-3.70581584	5.62370111	-2.3356941	0.04162727	0.51518485	-3.718568
17775520	Actc1	-3.86874115	7.29003102	-2.53721427	0.02948906	0.47278316	-3.41815221
17684853	Cfh	-4.39653841	6.60494908	-3.54787156	0.00528122	0.33714311	-1.90449653
17646902	Myh3	-4.49925955	5.78092786	-3.915194	0.00288496	0.29372865	-1.37581908
17647134	Myh8	-5.20719546	6.55886171	-4.92208933	0.00060174	0.21765968	-0.03654017

Tabla 2. En esta tabla se muestran los cinco transcritos más diferentemente sobre y sub expresados en tejido adiposo del grupo de sobrenutrición con respecto al control. Estos transcritos codifican a genes que cuya función está asociada al transporte celular (*Unc79*), unión celular (*Serpina3n*), estructura celular (*Hydin*), ATPasa (*actc1*) actividad motora (*myh3* y *8*), y actividad RHO GTPasa (*Arhgap36*), etc. La tabla es un fragmento del reporte "Top Table" obtenido con el programa R-project y el paquete limma.

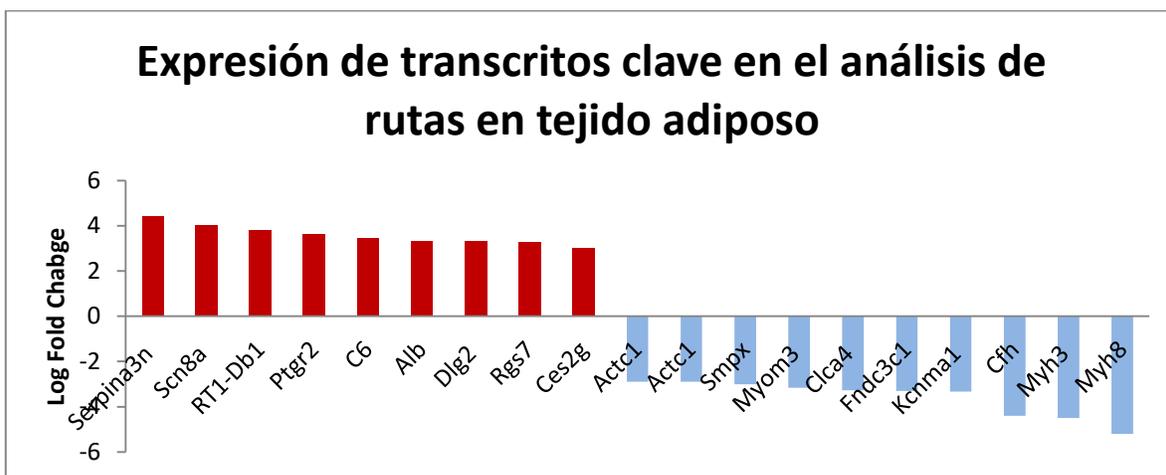


Figura 17. Representación gráfica de expresión relativa de transcritos con mayor diferencia en el de tejido adiposo del grupo de sobrenutrición con respecto al grupo control. La gráfica se realizó con el programa Excel.

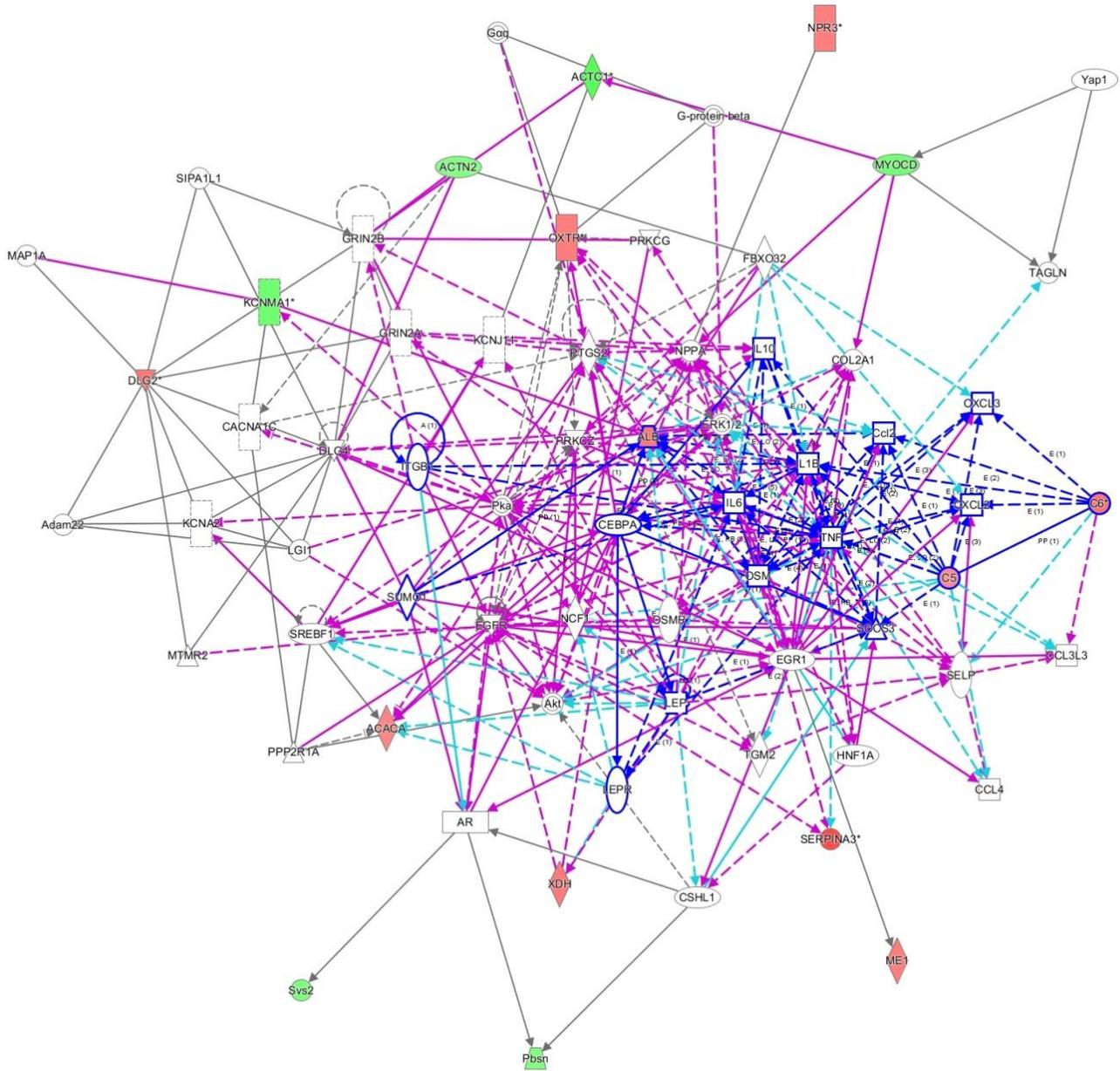


Figura 18. Red de interacción de tejido adiposo del grupo de sobrenutrición con respecto al grupo control. En esta Figura se muestra el resultado crudo del análisis de interacción vías de señalización. En esta representación se encuentran transcritos sub-expresados y sobre-expresados. Entre las principales vías enriquecidas se encuentran las vías de inflamación en azul. En cuanto a las rutas inhibidas se encuentran rutas asociadas a prolactina. El análisis se realizó en el programa IPA.

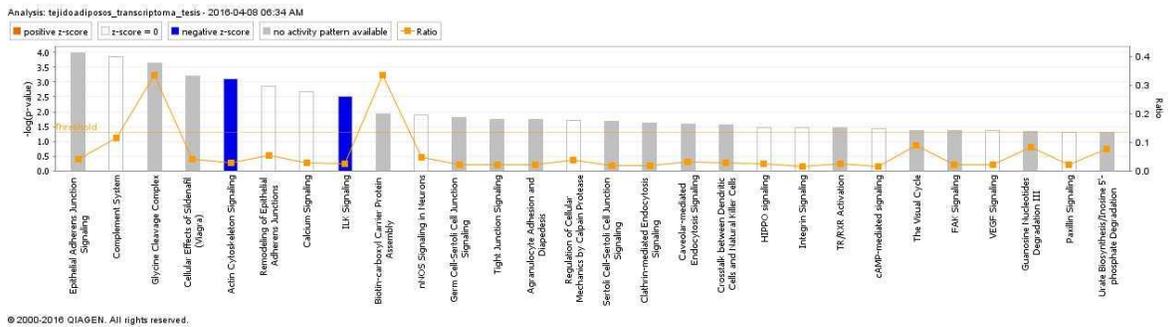


Figura 20. Principales rutas asociadas al transcriptoma de tejido adiposo del grupo de sobrenutrición con respecto al control. La gráfica muestra las principales vías de señalización que se encuentran con diferencias en el grupo de tratamiento. El análisis se realizó en el programa IPA. Los criterios de selección para incluir los transcritos en el análisis fueron $|\log fch| > 1.5$ y $p < 0.05$.

Análisis de vías

Para determinar las vías de señalización alteradas en los transcriptomas de hipotálamo y tejido adiposo, se realizó un análisis de vías con la herramienta bioinformática IPA, ejecutando un análisis de núcleos de señalización. De este análisis se obtuvieron vías con una puntuación de enriquecimiento basado en el número de transcritos diferencialmente expresados, el nivel de expresión, significancia estadística y la función biológica como muestran las Tablas 3 y 4.

Ruta metabólica alteradas en hipotálamo	Genes	Puntuación
Cáncer, daño sistémico y desarrollo celular .	ACACA, ADCYAP1R1 , ADM, AKT, CASP3, CAV1, CAV2, CHMP2B, CSHL1 , CUBN , DAB1, DPP4 , EPB41L1, F2, FOS, GALP , GCG, GJA1, IGF1R, LEP, LRP2 , MAPK, MRPS9 , NUMA1 , PKA, PLAGL1, PPARG, PPP2CA, PPP2R1A, PPP2R2D , PXN, RAPGEF4, SLC25A1 , SREBF1 Y TH.	15
Síntesis de proteínas , bioquímica de moléculas pequeñas, función y desarrollo del sistema endócrino.	ACE , CD44, CDC6 , CISH, CNTF, COL3A1 , CRH, CSHL1 , ERBB3, FCER1, GHRH, GUSB , HNF4A, IGF1, IGFBP3, IL6ST, INSULIN, IRF1, ITGA4 , ITGA6, ITGB1, ITGB4, MET, NR1H2, OGDH , PER1, PER2, PKC(S), PRL , PRLR , SOCS3, STAT5A/B, STAT5B, TNF Y TRH.	12
Enfermedad cardiovascular, movimiento celular , función y desarrollo de sistema muscular y esquelético.	ADAMTS7 Y COMP.	2
Transporte molecular, metabolismo de ácidos nucleicos y bioquímica de moléculas pequeñas.	ABCG2 Y TP53.	2
Desordenes del desarrollo y enfermedades del sistema reproductivo.	INSRR Y COMPLEJO NFKB.	2

Tabla 3. En esta tabla se muestra las rutas metabólicas enriquecidas del hipotálamo en el grupo de sobrenutrición en comparación con el grupo control. El análisis se realizó en el programa IPA. Los criterios de selección para incluir los transcritos en el análisis fueron $|\log fch| > 1.5$ y $p < 0.05$ y se aplicó un análisis de núcleos (core analysis). Los transcritos en rojo se encuentran sobre-expresados y los transcritos en verde están sub-expresados.

Rutas metabólica alteradas en tejido adiposo		Puntuación
Metabolismo de lípidos , bioquímica de moléculas pequeñas y transporte molecular.	ACACA , BCR , BRAF , C3, C5, CDC6, CPT1, CSK , DGAT2 , ERBB4, ERK1/2 , Fcer1, FCER1G, GPAM, GN, GUSB , INPP5D, LEP , LIPE, NFkB (complex), OXTR , PAG1, PIAS2 , Pka, Pkc(s), PLCG2, PLD1 , PPARGC1A , PTGDS, RYR2 , SCD , STAR , SYK , UCP2 Y XDH .	24
Señalización e interacción célula-célula, control de conducta , desarrollo y función del sistema nervioso.	Adam22, ANK3, CACNA1A, CHMP2B, CNKSR2 , CUBN , DLG2 , DLG4, ENAH , GNB1, GPHN, GRIN2A, GRIN2B, KCNA2, LGI1, LRP2, LRPAP1, MAGI2 , MAOA , MAP1A, MTMR2, MTOR, MYH14 , NFASC , PRKAR2B , RAPGEF4 , RIMS1 , Secretase gamma, SIPA1L1, SLC17A6 y TG .	12
Sobrevivencia y muerte celular , desarrollo celular, crecimiento celular y proliferación .	ABCG2 , AKAP6 , CDKN1A, E2f, EGFR, EGR1, ENPP2 , FOS, GABRA2, Histone h3, IGF1 , IGFBP3, IL6, IL1A, Lh, MAP3K5 , ME1 , NPPA, NPR3 , PARP1, PDE4D, PFKFB1 , Pkc(s), PLCE1, POMC, PRKD1, RB1, RELA, RYR1 , SERPINA3, TLR4, TNF, TNIP1 , TNN y TP53.	11

<p>Transporte molecular, bioquímica de moléculas pequeñas, mantenimiento y función celular.</p>	<p>ABHD12, Akt, Alpha catenin, ATP1A1, ATP1B1, ATP2A2, ATP2B3, CACNA1A, CAV1, CDH1, CSHL1, Csn1s1, CTNNB1, GHR, GJA1, HNF4A, IGF1, IGF1R, JAK2, KCNMA1, KIF2A, NCKAP1, OTOF, PCBD1, Pka, RAB3B, SLC1A2, SLC2A1, SLC4A4, SRC y SRD5A2.</p>	<p>9</p>
<p>Ciclo celular, cáncer, función y desarrollo de tejido conectivo.</p>	<p>ACAT1, ACTC1, AKAP12, ATP5C1, CCNE1, CDK1, CDK2, CDKN1B, CRYAB, DNAJB1, E2F1, ERN1, Hsp27, Hsp70, Hsp90, IDH2, KCNJ11, KLF4, KLK1, LAMA5, LAMB2, LAMC1, MYC, MYO1C, MYOCD, POLD1, POLR1A, POLR1B, POLR1C, POLR1E, RAB10, STUB1, TFRC y Tpm1.</p>	<p>6</p>

Tabla 4. En esta tabla se muestra las rutas metabólicas enriquecidas en tejido adiposo en el grupo de sobrenutrición en comparación con el grupo control. El análisis se realizó en el programa IPA. Los criterios de selección para incluir los transcritos en el análisis fueron $|\log fch| > 2.0$ y $p < 0.05$ y se aplicó un análisis de núcleos (core analysis). Los transcritos en rojo se encuentran sobre-expresados y los transcritos en verde están sub-expresados.

Análisis y discusión

En la presente investigación, estudiamos por primera vez los efectos de la sobrenutrición postnatal a corto plazo en el transcriptoma de hipotálamo y tejido adiposo en rata Wistar. Los principales cambios que encontramos en el transcriptoma de hipotálamo están implicados en procesos fisiológicos de inflamación, ritmos circadianos, apetito y saciedad. Mientras que, los principales cambios en el transcriptoma de tejido adiposo se encuentran asociados a inflamación, metabolismo de lípidos, estrés celular, sobrevivencia y proliferación celular. Los cambios en los transcriptomas son subsecuentes a un hiperfagia intrínseca del modelo como lo muestran los resultados de peso corporal [23, 32, 39]. Nuestros datos de fenotipo (peso elevado total de las ratas, de órganos y de tejidos) y bioquímicos de nuestro modelo de estudio, podrían dirigir algunos cambios en los transcriptomas de hipotálamo y tejido adiposo. En cuanto al peso, las ratas con sobrenutrición presentaron una ganancia de peso del 176.6 % a los 4 días de tratamiento, esta ganancia se preserva hasta el término del tratamiento con un incremento de peso del 183.2% (Figura 2). El incremento de peso también se observa en tejido adiposo, hígado, riñón, corazón y cerebro con significancia, pero no en hipotálamo (Figura 3-4). El crecimiento mayor de órganos y tejidos en el grupo de ratas sobrenutridas muestra un posible desarrollo acelerado, sin embargo, la grasa visceral retroperitoneal exhibe un mayor aumento de tejido adiposo asociado con sobrepeso. Nuestros datos también sugieren una respuesta inmediata a la disposición de alimento (hiperfagia indirecta), en consecuencia observamos un desarrollo más acelerado con una mayor cantidad de tejido adiposo, lo que corrobora trabajos ya reportados [40-44].

En el presente trabajo mostramos un incremento del tejido adiposo del 273.6% en las ratas con sobrenutrición, este evento es relevante debido a que, el aumento de tejido adiposo ha sido asociado con alteraciones en el perfil de lípidos, inflamación y resistencia a la insulina. En la última década el tejido adiposo ha sido considerado un órgano endócrino debido a los múltiples procesos fisiológicos que regula como la inflamación, apetito, estado pro-trombótico y el metabolismo de

lípidos sistémico. En este mismo sentido, encontramos aumento del valor porcentual del peso de tejido adiposo e hipotálamo principalmente, lo que significa que la carga funcional para conservar la homeóstasis es evidente, por un lado el tejido adiposo crece para retirar y almacenar el exceso de lípidos en torrente sanguíneo, y por otro lado el hipotálamo y el cerebro presentan un menor valor porcentual posiblemente relacionado a la alteración sub-expresión de genes en vías de desarrollo celular y sobre-expresión de genes envueltos en vías de inflamación [45].

En cuanto a los parámetros bioquímicos encontramos niveles elevados de glucosa en ayuno en un 9.21 % en el grupo de ratas sobrenutridas con respecto al grupo control. La glucosa elevada en ayunas es un fenómeno fisiológico consecuente de una disminución de la sensibilidad a la insulina en tejidos insulino dependientes y en una menor proporción en tejidos no insulino dependientes. La disminución en la sensibilidad a la insulina es una característica de la patología de la resistencia a la insulina, dicha alteración es una común denominador de enfermedades crónico degenerativas como la DMT 2 y enfermedades cardiovasculares [19, 46-51].

Los lípidos cuantificados en este trabajo fueron triglicéridos y colesterol total. En cuanto a los triglicéridos se observó un aumento del 73.4% en las ratas sobrenutridas. La elevación de triglicéridos es por excelencia un marcador de dislipidemia y se encuentra frecuentemente asociada con obesidad y resistencia a la insulina en etapas adultas Las ratas sobrenutridas que hemos llevado a un año presentaron pesos mayores con respecto al control después del destete]. En cuanto al colesterol total no se presentaron cambios. Generalmente la elevación de los triglicéridos en la dislipidemia ligada a obesidad, los niveles de colesterol total se encuentran elevados. Es posible que debido a la etapa temprana de vida de las ratas en estudio, la síntesis de colesterol *de novo* no se encuentra enriquecida. Por otro lado, la liberación hepática de triglicéridos se explicada por los lípidos reciclados del tejido adiposo y empaquetados en moléculas de muy baja densidad (VLDL, por su siglas en inglés), lipogénesis *de novo* y remanentes de quilomicrones. En estados de obesidad e hiperinsulinemia se conoce un

aumento de la lipólisis y liberación de ácidos grasos por parte del tejido adiposo. De esta manera podemos explicar que el aumento de triglicéridos en ayuno en ratas sobrenutridas se debe a un aumento de lipólisis del tejido adiposo y lipólisis *de novo* estimuladas por niveles de insulina y resistencia a leptina [29, 52, 53].

La función principal de la leptina es aumentar el gasto calórico e inducir saciedad vía sistema nervioso central. En nuestra investigación encontramos un aumento significativo del 51.1% en los niveles de leptina en suero de ratas sobrenutridas con respecto al grupo control. El aumento de los niveles de leptina con tal magnitud indica una retroalimentación negativa compensatoria al estado energético del organismo. El hipotálamo expresa receptores de leptina y el resultado de la transducción de la ruta de leptina es la saciedad y el gasto energético. Actualmente se sabe que, los niveles elevados de leptina representan resistencia a leptina y exhiben desordenes en el control energético sistémico ligado a exceso de macronutrientes calóricos, obesidad y resistencia a leptina [11, 54, 55].

Las ratas con sobrenutrición a 21 días en este trabajo muestran alteraciones como resistencia a la leptina e insulina, dislipidemia y obesidad. Dichas perturbaciones son reconocidas como “alteraciones similares a síndrome metabólico”. Esto debido a que, el concepto de síndrome metabólico fue desarrollado específicamente para humanos, la aplicación de criterios para considerar la presencia de síndrome metabólico en animales experimentales se limita debido a razones de diferencia fisiológica especie-específica [56].

Transcriptoma del tejido hipotalámico

En el transcriptoma del tejido hipotalámico en el grupo de ratas con sobrenutrición las principales vías de señalización alteradas son cáncer, daño celular, síntesis de proteínas, función y desarrollo del sistema endócrino, muscular y desordenes de desarrollo. Se encontraron 226 transcritos diferencialmente expresados, de los cuales 56.6% se encuentran con sobre-expresión, mientras el 43.4% están sub-

expresados. El análisis de vías y redes metabólicas muestran alteraciones en procesos fisiológicos con inflamación, ritmos circadianos, proliferación celular y reparación de ADN. En trastornos como síndrome metabólico y DMT2 se encuentran asociadas a una mayor metilación global, en consecuencia a esta metilación la expresión de ciertos grupos de genes pueden estar a la baja, mientras que otros pueden estar a la alza [57].

El estudio de la vía de leptina muestra resistencia a la leptina, este fenómeno genera disrupción en los circuitos de hambre y saciedad determinados por las comunicaciones neuronales entre el núcleo arqueado, el núcleo paraventricular y ventromedial. A pesar de que existe una sobre-expresión modesta en el receptor de leptina, otros genes que participan en la señalización como *socs 3*, *stat 3* y *5*, y *jak* se encuentran en sub-expresión. En este trabajo mostramos una resistencia a la leptina debido a la inhibición de respuesta río debajo de la cascada de señalización de esta hormona, esto concuerda con lo mencionado por Crujeiras en 2015 y Munzberg 2005. La resistencia a la leptina explica el fenómeno de hiperfagia en las ratas sobrenutridas, debido a que una atenuación de la saciedad conlleva a ingerir una cantidad mayor de alimento y contenido energético. Otro factor determinante para generar hiperfagia es la presencia de inflamación del hipotálamo, nuestros resultados muestran marcadores de inflamación y daño de ADN como *itga4*, *dpp4*, *cdc6* y *col31a* que intervienen en la señalización sistémica, como es el caso de la regulación de ciclo circadiano. Actualmente se sabe que los ritmos circadianos influyen en la generación de síndrome metabólico y DMT 2 e hipertensión [13, 46, 48, 55].

Transcriptoma de tejido adiposo

En el transcriptoma de tejido adiposo encontramos 948 transcritos desregulados de los cuales el 47% son transcritos sobre-expresados y el 53% sub-expresados. Los efectos de la sobrenutrición postnatal alteraron vías de señalización del metabolismo de lípidos, bioquímica de moléculas pequeñas, transporte molecular, sobrevivencia, muerte celular, desarrollo celular, crecimiento celular y proliferación.

Estas vías de señalización se encuentran involucradas en la generación de obesidad, resistencia a la insulina, resistencia a leptina, termogénesis e inflamación. Dichas vías han sido estudiadas en enfermedades metabólicas e inflamatorias como enfermedades cardiovasculares, diabetes, síndrome metabólico y resistencia a la insulina.

La sobrenutrición postnatal genera modificaciones en el transporte de lípidos, en respuesta a la constante ingesta de leche. En respuesta el tejido adiposo absorbe los lípidos en exceso y los almacena generando obesidad y sobrepeso. En este sentido el factor de transcripción *Erk1/2* se encuentra sub expresado, posiblemente debido a la interacción con marcadores inflamatorios de respuesta inmediata y map cinasas como *Map3k5*. Es posible sugerir que los adipocitos presentan un estado de hipertrófia y existe una inflamación local en el tejido adiposo en consecuencia a la sobrenutrición postnatal.

Por otro lado en transcrito que codifica para leptina presenta sobre expresión, lo cual correlaciona con la elevación cercana al 30% de leptina en suero (Figura 8), y aunado a esto, en hipotálamo la ruta de señalización de leptina esta inhibida. Estos datos demuestran la presencia del fenómeno de resistencia a leptina. Este evento es muy importante porque la disminución en el efecto fisiológico de la leptina conlleva a generar conducta de hiperfagia dirigida por el hipotálamo. La presencia de hiperfagia explica la constante ingesta de leche materna (ingesta medida indirectamente con el incremento de peso corporal) en las ratas y un aumento del tejido adiposo [55].

En cuanto la presencia de vías enriquecidas de inflamación, se sabe que, un estado de obesidad se acompaña por una inflamación sistémica de bajo grado. El exceso de ácidos grasos en sangre inducen activación de los factores de transcripción de respuesta inmune *nf-kb*, *jnk* y *AP-1*. Los resultados sugieren la presencia de un estado de inflamación sistémica que afecta al hipotálamo produciendo hiperfagia [58-64].

Otras rutas alteradas en el tejido adiposo son las sobrevivencia, proliferación y muerte celular. Esto es debido a la activación de rutas de la inflamación que comparten genes entre estos procesos. Estos datos sugieren que el tejido adiposo se encuentra también en estado de hiperplasia como se muestra en las rutas vías alteradas para este tejido (Tabla 3).

En resumen la sobrenutrición postnatal genera hiperfagia y obesidad subsecuente a resistencia a leptina en hipotálamo que altera los circuitos neuronales de saciedad. Por otro lado, una elevada carga energética constante de lípidos es distribuida en el sistema por quilomicrones, esto perturba el metabolismo en del hígado por lo cual se liberan en exceso glucosa y triglicéridos en ayunas. Los quilomicrones y las VLDL transfieren triglicéridos al tejido adiposo en específico a los adipocitos quienes los almacenan, lo que propicia hiperplasia e hipertrófia celular. De esta manera tenemos que, el transcriptoma de hipotálamo y tejido adiposo son la primera respuesta sistémica, lo que exhibe el fenómeno de “homeostasis adaptativa”. Dicha teoría menciona que el organismo se adapta a nivel de organismo tisular y celular a un ambiente adverso. El presente estudio se enfoca en el transcriptoma de hipotálamo y tejido adiposo como la primera respuesta genómica a la sobrenutrición postnatal a corto plazo, es necesario corroborar los hallazgos encontrados con estudios proteómicos, así se podrá comprender a diferentes niveles celulares la respuesta del sistema biológico a una exposición de sobrenutrición postnatal. Además, se necesitan estudios posteriores que investiguen los mecanismos por los cuales la sobrenutrición temprana genera alteraciones en la edad adulta.

Conclusiones

La sobrenutrición temprana generó un incremento de peso corporal de las ratas.

La sobrenutrición temprana también generó un peso mayor en hígado, corazón, riñón, tejido adiposo y cerebro, siendo el tejido adiposo el tejido con mayor incremento de peso. Además, el tejido adiposo es el que presenta mayor incremento entre los tejidos y el hipotálamo presenta un menor peso porcentual.

La sobrenutrición temprana genera hiperleptinemia compensatoria a una resistencia a leptina en la vía de señalización río abajo en hipotálamo a 21 días.

En el grupo de ratas sobrenutridas el transcriptoma en hipotálamo presentó expresión diferencial en las vías relacionadas a daño celular, síntesis de proteínas y desarrollo del sistema endócrino, mientras que, el tejido adiposo en el mismo grupo de estudio presento expresión diferencial en vías de metabolismo de lípidos, control de conducta, sobrevivencia, muerte celular, ciclo celular y proliferación principalmente.

La sobrenutrición temprana a 21 días genera alteraciones en la expresión genómica, morfológicas en hipotálamo y tejido adiposo. Lo que resulta en hiperfagia y alteración metabólica sistémica.

Literatura citada

1. Rooney K, Ozanne SE: **Maternal over-nutrition and offspring obesity predisposition: targets for preventative interventions.** *International Journal of Obesity* 2011, **35**(7):883-890.
2. Taylor PD, Poston L: **Developmental programming of obesity in mammals.** *Experimental Physiology* 2007, **92**(2):287-298.
3. Espinel-Bermudez MC, Robles-Cervantes JA, Villarreal-Hernandez LD, Villasenor-Romero JP, Hernandez-Gonzalez SO, Gonzalez-Ortiz M, Martinez-Abundis E, Perez-Rubio KG: **Insulin Resistance in Adult Primary Care Patients With a Surrogate Index, Guadalajara, Mexico, 2012.** *Journal of Investigative Medicine* 2015, **63**(2):247-250.
4. Bouret SG: **Early Life Origins of Obesity: Role of Hypothalamic Programming.** *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2009, **48**:S31-S38.
5. Bakos J, Zatkova M, Bacova Z, Ostatnikova D: **The Role of Hypothalamic Neuropeptides in Neurogenesis and Neuritogenesis.** *Neural Plast* 2016, **2016**:3276383.
6. Schneeberger M, Gomez-Valades AG, Ramirez S, Gomis R, Claret M: **Hypothalamic miRNAs: emerging roles in energy balance control.** *Front Neurosci* 2015, **9**:41.
7. Kalin S, Heppner FL, Bechmann I, Prinz M, Tschop MH, Yi CX: **Hypothalamic innate immune reaction in obesity.** *Nat Rev Endocrinol* 2015, **11**(6):339-351.
8. Wang Q, Liu C, Uchida A, Chuang JC, Walker A, Liu TM, Osborne-Lawrence S, Mason BL, Mosher C, Berglund ED *et al*: **Arcuate AgRP neurons mediate orexigenic and glucoregulatory actions of ghrelin.** *Molecular Metabolism* 2014, **3**(1):64-72.
9. Sousa-Ferreira L, de Almeida LP, Cavadas C: **Role of hypothalamic neurogenesis in feeding regulation.** *Trends Endocrinol Metab* 2014, **25**(2):80-88.
10. Schneeberger M, Gomis R, Claret M: **Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance.** *Journal of Endocrinology* 2014, **220**(2):T25-46.
11. Scherer T, Buettner C: **Yin and Yang of hypothalamic insulin and leptin signaling in regulating white adipose tissue metabolism.** *Rev Endocr Metab Disord* 2011, **12**(3):235-243.
12. Stefanidis A, Wiedmann NM, Adler ES, Oldfield BJ: **Hypothalamic control of adipose tissue.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2014, **28**(5):685-701.
13. Coll AP, Yeo GSH: **The hypothalamus and metabolism: integrating signals to control energy and glucose homeostasis.** *Current Opinion in Pharmacology* 2013, **13**(6):970-976.
14. Sohn JW: **Network of hypothalamic neurons that control appetite.** *BMB Rep* 2015, **48**(4):229-233.
15. Zhang W, Cline MA, Gilbert ER: **Hypothalamus-adipose tissue crosstalk: neuropeptide Y and the regulation of energy metabolism.** *Nutr Metab (Lond)* 2014, **11**:27.
16. Rodney A, Rhoades DRB: **Medical physiology : principles for clinical medicine.** Philadelphia :Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

17. Velasco C, Libran-Perez M, Otero-Rodino C, Lopez-Patino MA, Miguez JM, Cerda-Reverter JM, Soengas JL: **Ghrelin modulates hypothalamic fatty acid-sensing and control of food intake in rainbow trout.** *J Endocrinol* 2016, **228**(1):25-37.
18. Giralt M, Villarroya F: **White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions?** *Endocrinology* 2013, **154**(9):2992-3000.
19. Munzberg H, Bjornholm M, Bates SH, Myers MG, Jr.: **Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**(6):642-652.
20. Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP: **Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity.** *Diabetes & Metabolism* 2008, **34**(1):2-11.
21. Seoane-Collazo P, Ferno J, Gonzalez F, Dieguez C, Leis R, Nogueiras R, Lopez M: **Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis.** *Endocrine* 2015, **50**(2):276-291.
22. Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MCF, Dutra SCP, Lisboa PC: **Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats.** *Journal of Physiology-London* 2009, **587**(11):2647-2661.
23. Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD: **Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition.** *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2000, **279**(1):E83-E87.
24. Simmons RA: **Developmental Origins of Adult Disease.** *Pediatric Clinics of North America* 2009, **56**(3):449-+.
25. Stettler N: **Nature and strength of epidemiological evidence for origins of childhood and adulthood obesity in the first year of life.** *International Journal of Obesity* 2007, **31**(7):1035-1043.
26. Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Cokkinos DV: **Pathophysiology of dyslipidaemia in the metabolic syndrome.** *Postgrad Med J* 2005, **81**(956):358-366.
27. Li R, Jewell S, Grummer-Strawn L: **Maternal obesity and breast-feeding practices.** *Am J Clin Nutr* 2003, **77**(4):931-936.
28. Bany JA, VLB, RZ, ST, MG, Berg J: **Latina mothers feeding their children: A focus group pilot study** 2013, **3**:214-220.
29. Habbout A, Li N, Rochette L, Vergely C: **Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences.** *J Nutr* 2013, **143**(5):553-562.
30. Yim HE, Yoo KH, Bae IS, Hong YS, Lee JW: **Postnatal early overnutrition causes long-term renal decline in aging male rats.** *Pediatr Res* 2014, **75**(2):259-265.
31. Bei F, Jia J, Jia YQ, Sun JH, Liang F, Yu ZY, Cai W: **Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats.** *Lipids in Health and Disease* 2015, **14**.
32. M. Widdowson RA-M: **Some effects of accelerating growth. I. general somatic development.** *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 1960, **152**:188-206.

33. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AAH, Cicogna AC, Novelli JLVB: **Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats.** *Laboratory Animals* 2007, **41**(1):111-119.
34. **Trizol® Reagent.**
35. Chomczynski P, Sacchi N: **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 1987, **162**(1):156-159.
36. **Manual de usuario. Gene chip®. tanscriptoma completo. Ensayo de marcaje de blancos en sentido.** *Affimetrix* 2012.
37. Kong W, Vanderburg CR, Gunshin H, Rogers JT, Huang X: **A review of independent component analysis application to microarray gene expression data.** *Biotechniques* 2008, **45**(5):501-520.
38. C. R-E: **Microarray data analysis using R bioconductor. Full workflow handout.** 2015.
39. Kriz E, Martin C, Droux D, Poot AW: **Overnutrition and Early Development of Rat.** *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 1982, **52**(2):212-212.
40. Wiedmer P, Ortmann S, Klaus S: **Energy metabolism of young rats after early postnatal overnutrition.** *British Journal of Nutrition* 2002, **88**(3):301-306.
41. Keen CL, Lonnerdal B, Clegg M, Hurley LS: **Developmental-Changes in Composition of Rat Milk - Trace-Elements, Minerals, Protein, Carbohydrate and Fat.** *Journal of Nutrition* 1981, **111**(2):226-236.
42. Godbole VY, Grundleger ML, Pasquine TA, Thenen SW: **Composition of Rat Milk from Day-5 to Day-20 of Lactation and Milk Intake of Lean and Preobese Zucker Pups.** *Journal of Nutrition* 1981, **111**(3):480-487.
43. Russell JA: **Milk-Yield, Suckling Behavior and Milk Ejection in the Lactating Rat Nursing Litters of Different Sizes.** *Journal of Physiology-London* 1980, **303**(Jun):403-415.
44. Keen CL, Lonnerdal B, Clegg M, Hurley LS: **Developmental-Changes in Nutrient Composition of Rat Milk.** *Federation Proceedings* 1980, **39**(3):903-903.
45. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE: **Adipose Tissue: The New Endocrine Organ? A Review Article.** *Digestive Diseases and Sciences* 2009, **54**(9):1847-1856.
46. Yi CX, Meyer CW, Jastroch M: **Leptin action in the brain: How (and when) it makes fat burn.** *Molecular Metabolism* 2013, **2**(2):63-64.
47. Yi CX, Tschop MH: **Brain-gut-adipose-tissue communication pathways at a glance.** *Disease Models & Mechanisms* 2012, **5**(5):583-587.
48. Simonds SE, Cowley MA, Enriori PJ: **Leptin increasing sympathetic nerve outflow in obesity: A cure for obesity or a potential contributor to metabolic syndrome?** *Adipocyte* 2012, **1**(3):177-181.
49. Ohno K, Sakurai T: **Orexin neuronal circuitry: Role in the regulation of sleep and wakefulness.** *Frontiers in Neuroendocrinology* 2008, **29**(1):70-87.
50. Moura EG, Passos MCF, Rodrigues AL, Dutra SCP, Bonomo IT, Lisboa PC: **Leptin signaling pathway in thyroid from young and old rats after postnatal early overnutrition (PEO).** *Early Human Development* 2007, **83**:S112-S112.
51. Mobbs CV: **The "domino theory" of hunger: The hypothalamus is hot.** *Cell Metabolism* 2007, **5**(1):1-2.

52. Bartolome N, Aspichueta P, Martinez MJ, Vazquez-Chantada M, Martinez-Chantar ML, Ochoa B, Chico Y: **Biphasic adaptative responses in VLDL metabolism and lipoprotein homeostasis during Gram-negative endotoxemia.** *Innate Immun* 2012, **18**(1):89-99.
53. Blasiolo DA, Davis RA, Attie AD: **The physiological and molecular regulation of lipoprotein assembly and secretion.** *Molecular Biosystems* 2007, **3**(9):608-619.
54. Jeong JY, Lee DH, Kang SS: **Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice.** *Endocrinol Metab (Seoul)* 2013, **28**(4):288-296.
55. Crujeiras AB, Carreira MC, Cobia B, Andrade S, Amil M, Casanueva FF: **Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape.** *Life Sciences* 2015, **140**:57-63.
56. Reaven GM: **Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease.** *Diabetes* 1988, **37**(12):1595-1607.
57. Yara S, Lavoie JC, Levy E: **Oxidative stress and DNA methylation regulation in the metabolic syndrome.** *Epigenomics* 2015, **7**(2):283-300.
58. Font-Burgada J, Sun BC, Karin M: **Obesity and Cancer: The Oil that Feeds the Flame.** *Cell Metabolism* 2016, **23**(1):48-62.
59. Choi SK, Park S, Jang S, Cho HH, Lee S, You S, Kim SH, Moon HS: **Cascade regulation of PPARgamma(2) and C/EBPalpha signaling pathways by celastrol impairs adipocyte differentiation and stimulates lipolysis in 3T3-L1 adipocytes.** *Metabolism-Clinical and Experimental* 2016, **65**(5):646-654.
60. Valdearcos M, Xu AW, Koliwad SK: **Hypothalamic inflammation in the control of metabolic function.** *Annu Rev Physiol* 2015, **77**:131-160.
61. Glass CK, Olefsky JM: **Inflammation and Lipid Signaling in the Etiology of Insulin Resistance.** *Cell Metabolism* 2012, **15**(5):635-645.
62. Yshii LM, Denadai-Souza A, Vasconcelos AR, Kinoshita PF, Sogayar MC, Munhoz CD, Avellar MCW, Scavone C: **Activation of Nf-Kb Induced by Reactive Glia or Tnfalpha in Alpha Synuclein Overexpressed Sh-Sy5y Cells.** *Inflammation Research* 2011, **60**:213-213.
63. Toubal A, Treuter E, Clement K, Venticlef N: **Genomic and epigenomic regulation of adipose tissue inflammation in obesity.** *Trends Endocrinol Metab* 2013, **24**(12):625-634.
64. Dauncey MJ: **Genomic and Epigenomic Insights into Nutrition and Brain Disorders.** *Nutrients* 2013, **4**: 887-914.

Anexos

I.-Análisis de calidad de ARN de tejido hipotalámico mediante electroferogramas en bioanalizador.

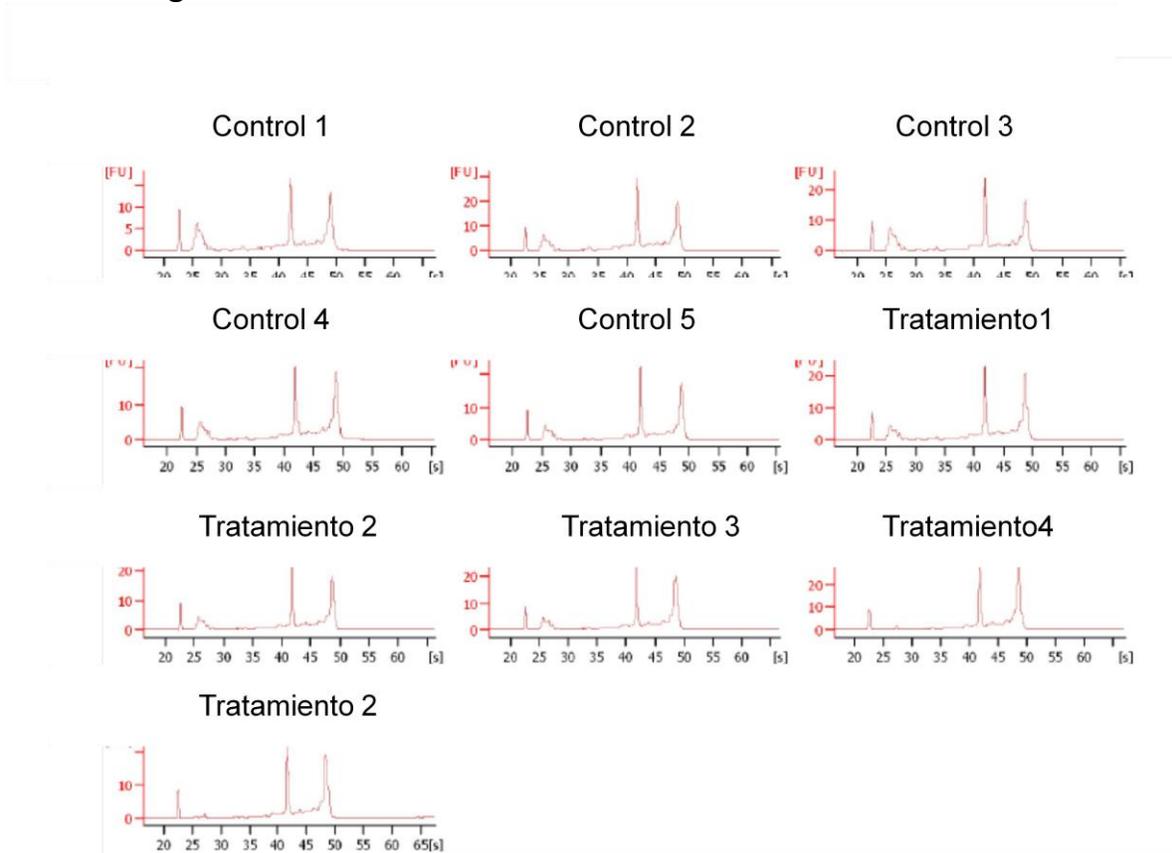


Tabla del número de integridad del ARN de tejido hipotalámico por cada muestra.

Valor del número de integridad del ARN (1:10, donde 10 es la mejor integridad)	
Tejido hipotalámico	
Control 1	8.2
Control 2	8.9
Control 3	8.4
Control 4	8.7
Control 5	9.2
Tratamiento 1	8.5
Tratamiento 2	8.7
Tratamiento 3	9.1
Tratamiento 4	8.9
Tratamiento 5	8.7

II.-Análisis de calidad de ARN de tejido adiposo mediante electroferogramas en bioanalizador.

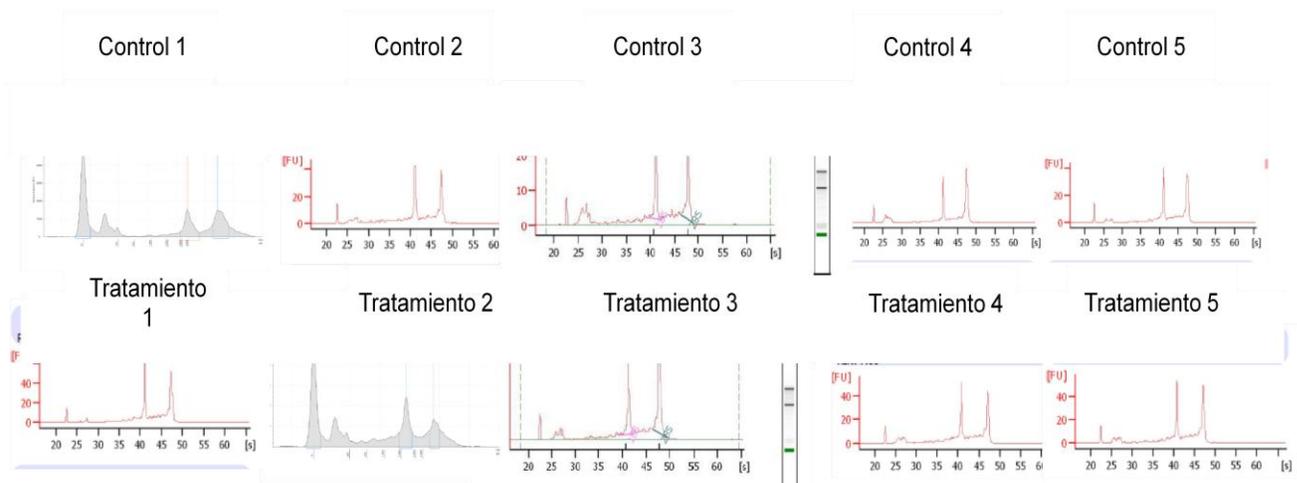


Tabla del número de integridad del ARN de tejido adiposo por cada muestra.

Valor del número de integridad del ARN (1:10, donde 10 es la mejor integridad)	
Tejido adiposo	
Control 1	8.4
Control 2	8.2
Control 3	8.1
Control 4	8.9
Control 5	8.7
Tratamiento 1	8.1
Tratamiento 2	7.3
Tratamiento 3	8.9
Tratamiento 4	7.6
Tratamiento 5	8.4