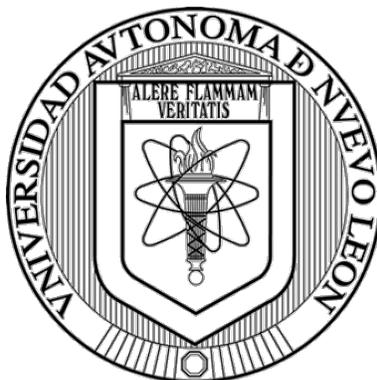


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTOS DE LA PROGRAMACIÓN NUTRICIONAL MATERNA EN LA
HOMEOSTASIS ENERGÉTICA Y LA DINÁMICA MITOCONDRIAL EN EL
HIPOTÁLAMO DE RATA**

Por

ROBBI ELIZABETH CÁRDENAS PÉREZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería
Genética**

OCTUBRE 2018

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**EFFECTOS DE LA PROGRAMACIÓN NUTRICIONAL MATERNA EN LA
HOMEOSTASIS ENERGÉTICA Y LA DINÁMICA MITOCONDRIAL EN EL
HIPOTÁLAMO DE RATA**

Por

M.C. ROBBY ELIZABETH CÁRDENAS PÉREZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería
Genética**

Director de la tesis

Dr C. Alberto Camacho Morales

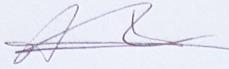
MONTERREY, N.L.

OCTUBRE 2018

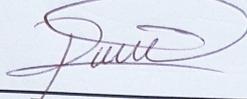
Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurobiología de la Obesidad del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en la Unidad de Neurometabolismo del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León, el Laboratorio de Investigación en Neurociencias del Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México y en el laboratorio de Genetics and Molecular Pathology, SA Pathology at Women's and Children's Hospital, University of Adelaide, Australia. Fue dirigido por el Dr. C. Alberto Camacho Morales, con la co-dirección de la Dra.C. Rocío Ortiz López, y como parte de la comisión la Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret, Dra. C. Lizeth Fuentes Mera y la Dra. C. Ana Laura Isabel de la Garza Hernández, todas ellas con adscripción de la UANL.

Efectos de la programación nutricional materna en la homeostasis energética y la dinámica mitocondrial en el hipotálamo de rata

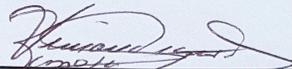
Aprobación de la Tesis:



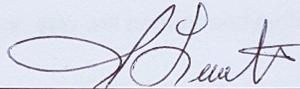
DR. C. ALBERTO CAMACHO MORALES
Director de la Tesis



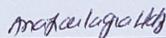
DRA.C. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ
Co-Director de la Tesis



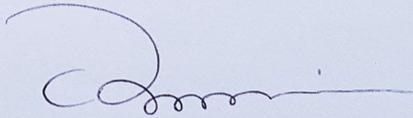
DR.C. VIVIANA CHANTAL ZOMOSA SIGNORET
Miembro de la Comisión



DRA.C. LIZETH ALICIA FUENTES MERA
Miembro de la Comisión



DR. C. ANA LAURA ISABEL DE LA GARZA HERNÁNDEZ
Miembro de la Comisión



DR. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ
Subdirector de Estudios de Posgrado

Dedicatoria

A la naturaleza que siempre ha sido mi fuente de inspiración:

*Look deep into **nature**, and then you will understand everything better*

Albert Einstein

Agradecimientos

Quiero primero agradecer a todas las personas que realmente creen en mi y que han podido alentarme a terminar esta etapa de mi vida profesional, sin ustedes quizás hubiera tirado la toalla.

A mi hermana Leticia que ha estado en estos meses ayudándome después de todos los problemas que hemos tenido. Te quiero mucho y aunque a veces no nos llevamos bien, eres quien me ha animado y escuchado.

A mi abuelita Juanita, que muchas veces me ha dicho cosas lindas para no desanimarme, que con su determinación y ganas de vivir me ha demostrado que cosas valen la pena.

A mis amigos, David, Luis, Américo, Lizeth y Abigail con los cuales he compartido desde hace muchos años un sin fin de pláticas y buenos ratos. También son quienes me han dado ayudado cuando lo he necesitado y siempre están con sus brazos abiertos.

A Ricardo y su familia, que han estado apoyándome estos últimos dos años, la verdad los aprecio y los quiero.

A Ana Esther por ser una gran amiga, que ha hecho que estos 4 años sean mejores, sin ti creo que habría perdido la cordura, te quiero mucho.

A mis compañeros de laboratorio y alumnos de servicio social: Wendy, Cindy, Miguel Ángel, Pedro, Alan, Roger, Ivan, Alejandro, Keyme, Jonathan, Lizbeth, Daniela, Gricelda, Karen y Kattia.

A Alex que siempre estuvo dispuesto a ayudarme desde el laboratorio hasta cuando había problemas en la casa, además de sus anécdotas que muchas veces me hacen reír.

Al Dr. Alberto Camacho que a pesar de las dificultades pudimos sacar adelante este proyecto y estoy muy agradecida por darme la oportunidad de hacer mi tesis de doctorado.

A la Dra. Ana Laura de la Garza que me ayudó en la realización de este proyecto con las dietas y que me asesoró en cuestiones de nutrición como de mi tesis.

También quiero agradecer a la Dra. Rocío Ortiz porque fue pieza fundamental para la realización de este trabajo, ya que varios experimentos fueron realizados en su laboratorio.

A la Dra. Viviana Zomosa y a la Dra. Lizeth Fuentes por sus consejos durante la revisión de esta tesis.

A la Facultad de Medicina y al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular por abrirme sus puertas.

A Juany y Ariadna por todo el apoyo brindado durante estos 4 años de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico proporcionado durante toda mi estancia durante el doctorado.

Financiamiento

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con apoyo de la convocatoria Sectorial Salud (255317) y Ciencia Básica (261420) para Alberto Camacho.

Resumen

M.C. Robbi Elizabeth Cárdenas Pérez

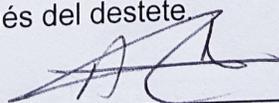
Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título del proyecto: Efectos de la programación nutricional materna en la homeostasis energética y la dinámica mitocondrial en el hipotálamo de rata

Número de páginas:

Candidato para titulación de: Doctorado en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

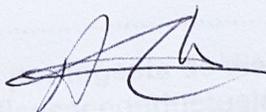
Introducción: La sobrealimentación en las madres incrementa el riesgo de disfunción metabólica en la descendencia. En modelos animales de obesidad inducida por dieta, la ingesta calórica promueve la alteración de la comunicación entre el Retículo endoplásmico (RE) y mitocondria. **Hipótesis:** La sobrealimentación materna durante el embarazo-lactancia con dieta grasa (HFD), grasa-azúcar (CAF) o azúcar (HSD) programa selectivamente la dinámica del RE-mitocondria en el hipotálamo de la descendencia induciendo disfunción metabólica, y puede exacerbarse por consumo de las mismas dietas después del destete. **Metodología:** Se emplearon ratas hembras Wistar alimentadas con dieta Control, HFD, CAF o HSD por 9 semanas para obtener la descendencia masculina. Al destete recibieron dieta control o la de su madre. Entre los días 21 o 60 de edad se determinaron parámetros metabólicos empleando kits de ELISA y la tecnología de lipidómica, y a los 60 días se disecó el hipotálamo para determinar marcadores de la dinámica RE-mitocondria por qPCR, Western Blot y microscopia electrónica de transmisión (TEM). La función mitocondrial se analizó por microscopia confocal y sondas de actividad de RE-mitocondria (TMRM, ER-Green Tracker, Rhod-2) en la línea celular de hipotálamo mHypoA-CLU192. **Resultados:** La programación materna desreguló la sensibilidad a la glucosa, leptina e insulina y promovió aumento en el peso del tejido adiposo blanco. Además, se identificaron cambios en las concentraciones de diacilglicéridos, triglicéridos y esfingolípidos. Las dietas HFD y CAF programaron incremento en la fusión mitocondrial (incremento de mitofusina y decremento de DRP1) en el hipotálamo de la descendencia. De interés, la exposición a CAF promueve cambios morfológicos en la interacción RE-mitocondria e induce incremento en el evidenciado por TEM. Finalmente, la estimulación de neuronas de hipotálamo con el ácido palmítico incrementó la sobrecarga de Ca^{2+} hacia la matriz mitocondrial que correlaciona con defectos en su disfunción. **Conclusiones:** La programación materna por dieta hipercalórica induce cambios en la dinámica mitocondrial del hipotálamo, disfunción metabólica y cambios en las concentraciones de lípidos en suero de la descendencia masculina. Estos efectos pueden exacerbarse por el consumo de dieta hipercalórica después del destete.



Dr. C. Alberto Camacho Morales

Abstract

Background: Maternal overnutrition including pre-pregnancy, pregnancy and lactation promotes a lipotoxic insult leading to metabolic dysfunction in offspring. Diet-induced obesity models (DIO) show that changes in hypothalamic mitochondria fusion and fission dynamics modulate metabolic dysfunction. Using three selective diet formula including a High fat diet (HFD), Cafeteria (CAF) and High Sugar Diet (HSD), we hypothesized that maternal diets exposure program leads to selective changes in hypothalamic mitochondria fusion and fission dynamics in male offspring leading to metabolic dysfunction which is exacerbated by a second exposure after weaning. **Methods:** We exposed female Wistar rats to nutritional programming including Chow, HFD, CAF, or HSD for 9 weeks (pre-mating, mating, pregnancy and lactation) or to the same diets to offspring after weaning. We determined body weight, food intake and metabolic parameters in the offspring from 21 to 60 days old. Hypothalamus was dissected at 60 days old to determine mitochondria-ER interaction markers by mRNA expression and western blot and morphology by transmission electron microscopy (TEM). Mitochondrial-ER function was analyzed by confocal microscopy using hypothalamic cell line mHypoA-CLU192. **Results:** Maternal programming by HFD and CAF leads to failure in glucose, leptin and insulin sensitivity and fat accumulation. Additionally, HFD and CAF programming promote mitochondrial fusion by increasing the expression of MFN2 and decreasing DRP1, respectively. Further, TEM analysis confirms that CAF exposure after programming leads to an increase in mitochondria fusion and enhanced mitochondrial-ER interaction, which partially correlates with metabolic dysfunction and fat accumulation in the HFD and CAF groups. Finally, we identified that lipotoxic palmitic acid stimulus in hypothalamic cells increases Ca^{2+} overload into mitochondria matrix leading to mitochondrial dysfunction. **Conclusions:** We concluded that maternal programming by HFD induces hypothalamic mitochondria fusion, metabolic dysfunction and fat accumulation in male offspring, which is exacerbated by HFD or CAF exposure after weaning, potentially due to mitochondria calcium overflux.



Dr. C. Alberto Camacho Morales

Contenido

| | |
|--|----|
| Aprobación de la tesis | 4 |
| Dedicatoria | 5 |
| Agradecimientos | 6 |
| Resumen | 9 |
| Abstract..... | 10 |
| Índice de Figuras | 14 |
| Índice de Tablas | 15 |
| Lista de Abreviaturas | 16 |
| 1. Introducción..... | 18 |
| 2. Antecedentes..... | 22 |
| 2.1 Regulación de la homeostasis energética del cuerpo..... | 22 |
| 2.2 El hipotálamo y su función en el metabolismo energético | 22 |
| 2.2.1 Anatomía del hipotálamo..... | 22 |
| 2.2.2 El metabolismo energético en el hipotálamo: Papel del núcleo arcuato | 25 |
| 2.2.3 Integración hormonal del hipotálamo en la regulación del metabolismo energético corporal: Papel de la insulina, leptina y ghrelina..... | 28 |
| 2.3 La lipotoxicidad es un mecanismo patogénico que genera daño metabólico en órganos claves para el desarrollo de DMT2 | 32 |
| 2.3.1 Generación de lípidos lipotóxicos: Síntesis de ceramidas..... | 33 |
| 2.3.2 Ceramidas, diacilgliceroles y lípidos saturados: Especies de lípidos clave en el desarrollo de daño lipotóxico tisular asociado a la generación de diabetes..... | 34 |
| 2.4 El estrés del retículo endoplásmico y la disfunción mitocondrial son mecanismos de daño lipotóxico en el sistema nervioso activados durante la obesidad..... | 37 |
| 2.4.1 Activación del estrés de RE en la obesidad propicia el desarrollo de DMT2..... | 37 |
| 2.4.2 La lipotoxicidad durante la obesidad altera la dinámica y función mitocondrial..... | 39 |
| 2.5 La programación materna por ingesta de dietas hipercalóricas y obesidad fomenta alteraciones metabólicas y conductuales en la descendencia | 44 |
| 3. Justificación | 47 |
| 4. Preguntas experimentales..... | 48 |
| 5. Hipótesis | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 6. Objetivos | 49 |
| 6.1 Objetivo general | 49 |
| 6.2 Objetivos específicos | 49 |
| 7. Material y métodos | 49 |
| 7.1 Anticuerpos | 49 |
| 7.2 Reactivos | 50 |
| 7.3 Línea celular | 50 |
| 7.4 Dietas..... | 50 |
| 7.5 Animales y manejo..... | 51 |
| 7.6 Modelo Animal de programación materna mediante las dietas HFD, CAF Y HSD..... | 52 |
| 7.7 Pruebas de tolerancia a la glucosa y a la insulina (GTT e ITT)..... | 53 |
| 7.8 Disección y homogenizado del tejido cerebral y recolección de suero ... | 53 |
| 7.9 Determinación en suero de las concentraciones de insulina y leptina | 53 |
| 7.10 Determinación del perfil lipídico en suero por medio de Cromatografía en fase Líquida-Espectrometría de masas | 54 |
| 7.11 Aislamiento de ARN y RT-PCR | 54 |
| 7.12 PCR cuantitativa (qPCR)..... | 55 |
| 7.13 Análisis de proteínas por medio de Western Blot | 55 |
| 7.14 Microscopia de transmisión electrónica..... | 56 |
| 7.16 Análisis de la masa mitocondrial, potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) y actividad del RE empleando un sistema <i>in vitro</i>..... | 56 |
| 7.17 Concentración de Ca^{2+} mitocondrial | 57 |
| 7.18 Análisis estadístico..... | 57 |
| 8. Resultados | 58 |
| 8.1.1 La dieta de CAF altera el peso de las madres durante la gestación | 58 |
| 8.1.2 Las dietas CAF y HSD alteran el peso promedio de la descendencia al nacer..... | 59 |
| 8.1.3 La programación materna con dietas HFD y CAF y el consumo de dieta de CAF después del destete alteran el peso corporal..... | 59 |
| 8.1.4 La exposición a dieta HFD durante la programación materna y posterior al destete disminuye el consumo de alimento y la eficiencia alimentaria..... | 60 |
| 8.1.5 La exposición a las dietas CAF y HFD durante el embarazo y lactancia altera la sensibilidad a la glucosa e insulina..... | 62 |

| | |
|---|----|
| 8.1.6 La exposición a dieta HFD y CAF durante la programación materna y posterior al destete aumenta las concentraciones de insulina y leptina en la descendencia..... | 63 |
| 8.1.7 La exposición a dietas hipercalóricas durante la programación materna y posterior al destete alteran el peso del hígado y tejido adiposo en la descendencia..... | 64 |
| 8.2 La exposición a las dietas HFD, CAF y HSD durante la programación materna y posterior al destete alteran el perfil lipídico en el suero de la descendencia..... | 65 |
| 8.2.1 Diacilglicéridos..... | 66 |
| 8.2.2 Triglicéridos..... | 67 |
| 8.2.3Esfingolípidos..... | 69 |
| 8.2.3.1 Ceramidas..... | 69 |
| 8.2.3.2 Dihexosilceramidas (DHC)..... | 69 |
| 8.2.3.3 Dihidroceramidas (dHCer)..... | 69 |
| 8.2.3.4 Monohexosilceramidas (MHC)..... | 69 |
| 8.2.3.5 Esfingosinas..... | 70 |
| 8.2.4 Concentración de ceramidas en pacientes obesos y pacientes obesos con DMT2..... | 72 |
| 8.3 La exposición a las dietas hipercalóricas durante la gestación y lactancia promueve estrés del RE y cambios en la dinámica de fusión y fisión mitocondrial en el hipotálamo de la descendencia masculina..... | 73 |
| 8.4.1 La dieta CAF durante la gestación y lactancia más una segunda exposición después del destete promueve alteraciones morfológicas en la dinámica del RE y mitocondria..... | 74 |
| 9. Discusión..... | 77 |
| 9.1 La programación nutricional por dietas HFD y CAF favorecen la hiperfagia y promueven la presencia de alteraciones metabólico-hormonales en la descendencia..... | 78 |
| 9.2 Identificación del firmas lipídicas selectivas durante el daño lipotóxico en la descendencia de madres expuestas a programación nutricional..... | 81 |
| 9.2.1 La Cer 24:0 incrementa en pacientes con obesidad y DMT2..... | 84 |
| 9.3 La programación materna por exposición a dietas hipercalóricas HFD y CAF incrementa la fusión mitocondrial en el hipotálamo de la descendencia..... | 84 |
| 9.4 El ácido palmítico incrementa la interacción entre el RE-mitocondria lo que causa un aumento del Ca ²⁺ del RE hacia la mitocondria en un modelo <i>in vitro</i> de neuronas de hipotálamo..... | 86 |

| | |
|-------------------------------|-----------|
| 10. Conclusiones | 87 |
| 11. Perspectivas | 88 |
| 12. Referencias | 88 |
| Anexos | 98 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Prevalencia de obesidad en adultos y menores de 0-19 alrededor del mundo..... | 19 |
| Figura 2. Estructura del hipotálamo, vista frontal del hipotálamo..... | 24 |
| Figura 3. Estructura del hipotálamo, vista sagital del hipotálamo..... | 25 |
| Figura 4. Las neuronas del núcleo arcuato (ARC)..... | 27 |
| Figura 5. Mecanismos neurales y endocrinos del balance energético..... | 28 |
| Figura 6. Hormonas y receptores que regulan el metabolismo energético..... | 31 |
| Figura 7. Cascada de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y de estrés de RE..... | 38 |
| Figura 8. Las membranas asociadas a mitocondrias (MAMs) y los procesos de dinámica mitocondrial: Fusión y fisión..... | 44 |
| Figura 9. Estrategia experimental del modelo de programación materna..... | 52 |
| Figura 10. Peso de las hembras desde la etapa de pre-gestación hasta días antes del nacimiento de las crías..... | 58 |
| Figura 11. Peso de las crías al momento del nacimiento..... | 59 |
| Figura 12. Efecto de la programación materna en el peso de la descendencia masculina después del destete al día 21 de edad hasta la séptima semana de vida..... | 60 |
| Figura 13. Efecto de la programación materna en el consumo de alimento, calorías y eficiencia de alimento de los grupos de programación materna y de dietas después del destete..... | 61 |
| Figura 14. Efecto de la programación materna en la homeostasis de glucosa de la descendencia masculina..... | 63 |

| | |
|--|----|
| Figura 15. Efecto de la programación materna por las dietas en el peso del hígado y tejido adiposo de la descendencia..... | 65 |
| Figura 16. Concentraciones de diacilglicéridos..... | 66 |
| Figura 17. Concentración de triglicéridos..... | 68 |
| Figura 18. Concentración de Esfingolípidos en suero..... | 71 |
| Figura 19. Mapa de calor de las concentraciones de ceramidas en pacientes obesos y obesos con DMT2..... | 72 |
| Figura 20. Efecto de la programación materna nutricional en el RE y en la fusión y fisión mitocondrial en la expresión de ARNm y proteína en el hipotálamo de la descendencia..... | 74 |
| Figura 21. Efecto de la programación materna nutricional en la ultraestructura celular del hipotálamo de la descendencia..... | 75 |
| Figura 22. Lipotoxicidad inducida por PAL disminuye el $\Delta\Psi_m$, la masa mitocondrial y el estrés de RE..... | 76 |
| Figura 23. Lipotoxicidad del PAL induce cambios en los niveles de Ca^{2+} en la mitocondria..... | 77 |
| Figura 24. Principales vías de biosíntesis de lípidos alteradas por la programación materna y el consumo por parte de la descendencia de dietas hipercalóricas..... | 83 |
| Figura 25. Hipótesis del modelo del flujo de calcio del RE a la mitocondria..... | 87 |

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Los diez principios de la programación propuestos por Nathanielsz y colaboradores..... | 45 |
| Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la expresión de proteínas de fusión y fisión mitocondrial..... | 49 |
| Tabla 3. Reactivos utilizados durante los experimentos..... | 50 |
| Tabla 4. Línea de hipotálamo de ratón utilizada durante los experimentos de función mitocondrial y de RE con estimulación de ácido palmítico..... | 50 |
| Tabla 5. Las dietas utilizadas durante la programación nutricional materna y también consumidas por la descendencia masculina..... | 51 |

Tabla 6. Concentraciones de insulina y leptina de la descendencia masculina.....64

Tabla 7. Resumen de resultados metabólicos de los los diferentes grupos.....80

Lista de Abreviaturas

| Nombre | Abreviatura |
|---|-------------------------------------|
| • Ácido desoxirribonucleico | ADN |
| • Ácido desoxirribonucleico complementario | ADNc |
| • Ácido desoxirribonucleico mitocondrial | ADNmt |
| • Ácidos grasos libres | AGL |
| • Ácidos grasos saturados | AGS |
| • Ácido palmítico | PAL |
| • Ácido ribonucleico | ARN |
| • Ácido ribonucleico mensajero | ARNm |
| • Agouti related peptide | AgRP |
| • Albúmina de suero bovino | BSA |
| • Análisis de varianza | ANOVA |
| • Calcio | Ca²⁺ |
| • Ceramidas | Cer |
| • Cloruro de Calcio | CaCl₂ |
| • Cloruro de Potasio | KCl |
| • Cloruro de Sodio | NaCl |
| • Desviación estándar | SD |
| • Diabetes mellitus tipo 2 | DMT2 |
| • Dieta Alta en Azúcar | HSD |
| • Dieta Alta en Grasa | HFD |
| • Dieta de Cafetería | CAF |
| • Dihexosilceramidas | DHC |
| • Dihidroceramidas | dHCer |
| • Dióxido de carbono | CO₂ |
| • Especies reactivas de oxígeno | ROS |
| • Fosfato de potasio monobásico | KH₂PO₄ |
| • Grados Celsius | °C |
| • Gramos | g |
| • Heat Shock Protein A 5 | Hspa5 |
| • Hora | h |
| • Índice de masa corporal | IMC |
| • Kilocaloría | Kcal |
| • Inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1 | Ip3r1 |

| | |
|--|-------------------------|
| • Dynamin-related protein 1 | Drp1 |
| • Medio de registro | MR |
| • Microlitro | μl |
| • Micromolar | μM |
| • Microscopia electrónica de transmisión | TEM |
| • Minuto | min |
| • Mitochondria transcription factor A | Tfam |
| • Mitofusina | Mfn |
| • Mitofusina 2 | Mfn2 |
| • Monohexosilceramidas | MHC |
| • Nanomolar | nM |
| • Neuropeptido Y | NPY |
| • Núcleo arcuato | ARC |
| • Obesidad inducida por dieta | OID |
| • Optic Atrophy 1 (Mitochondrial Dynamin Like GTPase) | Opa1 |
| • Proopiomelanocortina | POMC |
| • Potencial de membrana | ΔΨ_m |
| • Prueba de tolerancia a la glucosa | GTT |
| • Prueba de tolerancia a la insulina | ITT |
| • Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa | qPCR |
| • Reacción en cadena de la polimerasa, transcriptasa reversa | RT-PCR |
| • Respuesta a proteínas mal plegadas | UPR |
| • Retículo Endoplásmico | RE |
| • Segundo | s |
| • Sistema Nervioso Central | SNC |
| • Suero fetal bovino | SFB |
| • Sulfato de Magnesio | MgSO₄ |
| • Teoría de los orígenes de la salud y la enfermedad durante el desarrollo | DOHaD |
| • Tetrametilrodamina | TMRM |
| • Tetraóxido de osmio | OsO₄ |
| • Tris(hidroximetil)aminometano | TRIS |
| • Unidad | U |
| • Western blot | WB |

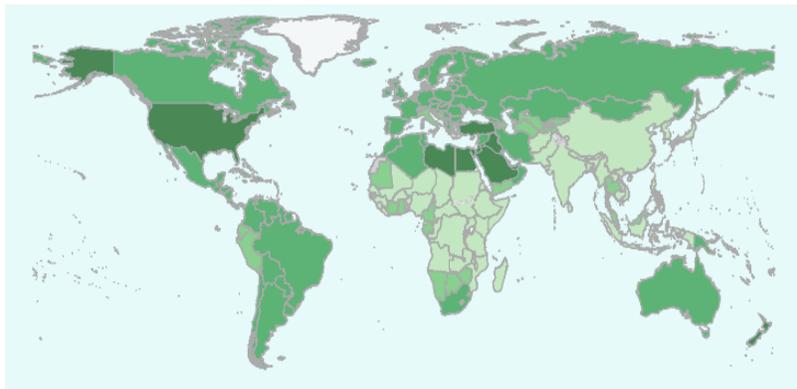
1. Introducción

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud ("Indicadores por Estado | OMENT," 2017). Un índice de masa corporal (IMC), igual o superior a 25 kg/m² se categoriza como sobrepeso y un IMC igual o superior a 30 kg/m² se categoriza como obesidad ("Indicadores por Estado | OMENT," 2017). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (2014), se estima que hay más de 1900 millones de adultos con sobrepeso-obesidad, y 41 millones de niños menores de cinco años que se incluyen en esta estadística ("Indicadores por Estado | OMENT," 2017) (Fig. 1). México, junto a los Estados Unidos, presentan un 30% de población adulta con obesidad que se ubica en los primeros lugares de prevalencia mundial (Barrera-Cruz, Rodríguez-González, & Molina-Ayala, 2013). La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino, ENSANUT MC 2016, evidenció que la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en niños de 5-11 años fue de 33.2%, en adolescentes de 12-19 años fue de 36.3% y en adultos mayores a 20 años de 71.2% (Palacios Hernández, Alanis, & de la Cruz, 2017).

La presencia de obesidad no sólo representa un riesgo de fenotipo estético sino que se ha asociado al incremento de la susceptibilidad a desarrollar enfermedades crónico-degenerativas, entre ellas, problemas cardiovasculares, hipertensión, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), hiperlipidemia, infarto, algunos tipos de cáncer, apnea del sueño, enfermedades del hígado y la vesícula biliar, osteoartritis y problemas ginecológicos (Williams, Mesidor, Winters, Dubbert, & Wyatt, 2015). Entender las causas precisas que han conducido al incremento explosivo de obesidad-sobrepeso en nuestra sociedad es complicado. Se propone que la transición demográfica, la epidemiológica y cambios en la nutrición, son sólo algunos factores que han incrementado el sobrepeso y la obesidad en las últimas dos décadas (Popkin & Gordon-Larsen, 2004). En particular, las sociedades modernas han aumentado el consumo de alimentos procesados ricos en grasas saturadas, azúcar y bajos en fibra, siendo conocida como dieta occidental (Popkin & Gordon-Larsen, 2004). Además, el decremento de la actividad física, la ausencia de sueño y el estrés, pueden incidir en el desarrollo

de estas patologías. Se ha propuesto actualmente que la nutrición de los padres puede tener efectos transgeneracionales que modulan el incremento o prevención del desarrollo de obesidad o enfermedades crónicas en la descendencia, siendo de importancia para esta tesis (Aiken & Ozanne, 2014).

Obesidad en adultos alrededor del mundo



Obesidad en menores de 0-19 años alrededor del mundo

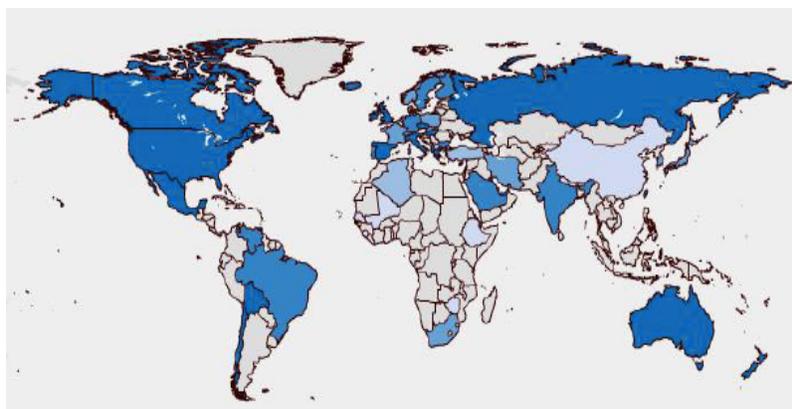


Figura 1 . Prevalencia de obesidad en adultos y menores de 0-19 años alrededor del mundo. En verde, la cantidad de adultos con obesidad por país, entre más oscuro el tono de verde mayor el índice de obesidad. En azul, la cantidad de menores de 0-19 años por país, entre más oscuro el tono de azul, mayor índice de obesidad. Modificado de "WHO | Obesity and overweight," 2017.

Ejemplos de estos efectos se encuentran los cambios en la alimentación por exceso o falta de alimentos evidenciados durante la hambruna holandesa de 1944, el sitio de Leningrado de 1942 a 1944, la gran hambruna china de los años 1958 a 1961 y también el estudio de Överkalix, un pequeño pueblo al norte de Suecia con registros desde 1890 hasta la actualidad (Vaiserman, 2011). Con ello, estos datos epidemiológicos proponen que condiciones de desnutrición puede inducir trastornos en la descendencia que incluyen a la DMT2, enfermedades cardiovasculares, y de tipo de conductuales, tales como la esquizofrenia (Vaiserman, 2011). De este modo, se ha propuesto la teoría de los orígenes de la salud y la enfermedad durante el desarrollo (DOHaD, por sus siglas en inglés). La DOHaD propone que los estímulos del medio ambiente durante la periconcepción, la gestación y la lactancia modula el desarrollo de los individuos, conduciendo a la predisposición a enfermedades durante etapas posteriores de la vida (Barker, 1990).

Si bien la DOHaD es un proceso conocido, ha sido difícil de identificar los principales actores moleculares y fisiológicos de esta programación en la salud o enfermedad de la descendencia. Para identificar tales mecanismos se han empleado modelos animales en donde se expone a madres a dieta alta en grasa (HFD), cafetería (CAF) o alta en azúcar (HSD) durante los periodos susceptibles del desarrollo embrionario los cuales, se conoce, inducen en la descendencia falla metabólico, e incrementan la susceptibilidad a presentar resistencia a insulina, DMT2, enfermedades cardiovasculares e hipertensión, hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis (Wankhade, Chintapalli, Zhong, Kang, & Shankar, 2016). Sin embargo, la caracterización de las alteraciones celulares en los diferentes tejidos durante la programación materna no ha sido totalmente esclarecida.

Uno de los mecanismos moleculares para explicar el efecto deleterio de la ingesta de dietas hipercalóricas durante la programación materna de la descendencia y su mantenimiento a través de diferentes generaciones, es la lipotoxicidad. La lipotoxicidad se define como la acumulación de lípidos, especialmente de ácidos grasos saturados y especies de lípidos como las

ceramidas entre otros, en tejido no adiposo que causa efectos adversos en la homeostasis metabólica (Engin, 2017). La lipotoxicidad induce la activación de estrés de RE y disfunción mitocondrial influyendo en la homeostasis celular (Engin, 2017). A la fecha, se ha reportado que la lipotoxicidad asociada a la obesidad materna induce estrés de RE, disfunción mitocondrial, alteraciones en la cantidad de ADNmt y en el epigenoma de los óvulos (McPherson et al., 2015). Algunos de efectos también pueden ser identificados en los blastocistos, y de hecho pueden preservarse en el hígado de los fetos (McPherson et al., 2015). Recientemente se ha identificado que la lipotoxicidad promueve alteraciones en la morfología mitocondrial del hígado y cerebro (Arruda et al., 2014; Cárdenas-Pérez & Camacho, 2016; Diaz et al., 2015) posiblemente vinculadas a los procesos de fusión y fisión mitocondrial (Youle & Van Der Bliek, 2012), a través de las enzimas guanosina trifosfatasa (GTPasas).

Así, la programación materna por dietas hipercalóricas en modelos murinos disminuye la expresión de las proteínas OPA1 y DRP1 en el músculo esquelético de la descendencia femenina (Saben et al., 2016) y en el caso de los machos, altera la actividad catalítica mitocondrial a nivel de músculo esquelético (Pileggi et al., 2016). Aunado a lo anterior, estos cambios pueden mantenerse a través de tres generaciones (Saben et al., 2016). Interesantemente, el efecto negativo de la lipotoxicidad sobre la homeostasis metabólica se extiende hasta el sistema nervioso a nivel del hipotálamo, en donde se ha identificado altera las señales neurológicas que regulan el hambre y la saciedad (De Souza et al., 2005). Así, intervenciones nutricionales que mejoren el medio ambiente en el útero para una mejor programación fetal podrían tener un gran impacto para la prevención del desarrollo de la obesidad y enfermedades metabólicas relacionadas como la obesidad-DMT2 y alteraciones en conductas de comportamiento de la descendencia.

En su conjunto, en ésta tesis se identificó el efecto selectivo de la ingesta de dietas hipercalóricas durante la programación materna (perigestacional,

gestacional y lactancia) en el desarrollo de lipotoxicidad y su efecto en el neurodesarrollo a través de cambios substanciales a nivel de la estructura y función del RE y la mitocondria. Además, se evidenció el impacto de la programación materna sobre las alteraciones neuronales en el neurodesarrollo y su asociación con la disfunción metabólica en la descendencia y la susceptibilidad a presentar obesidad-DMT2.

2. Antecedentes

2.1 Regulación de la homeostasis energética del cuerpo

La homeostasis energética es el control del balance de energía e involucra la regulación del consumo de energía y el gasto energético (Morton, Meek, & Schwartz, 2014). El consumo de energía está regulado principalmente por el apetito, que a su vez está controlado por factores neuroreguladores (hormonas y neurotransmisores) (Morton et al., 2014). Por otro lado, el gasto energético está constituido por tres principales componentes: metabolismo basal, termogénesis y actividad física. En este sentido, el cerebro juega un papel importante en mantener la homeostasis energética (Morton et al., 2014). En los mamíferos uno de los centros de control más importantes de la homeostasis de energía y del apetito es el hipotálamo, el cual se encarga de la integración de las señales hormonales y de energía de la periferia.

2.2 El hipotálamo y su función en el metabolismo energético

2.2.1 Anatomía del hipotálamo

El hipotálamo es un área del Sistema Nervioso Central (SNC) específicamente del diencefalo, localizada debajo del tálamo (Dudas, 2013). Su nombre viene del prefijo griego hypo (ὑπό) y del sustantivo griego thalamos (θάλαμος) que significa lecho nupcial, este nombre acuñado por su posición debajo de la región del tálamo donde llegan los estímulos sensoriales con excepción del olfato (Dudas, 2013). El hipotálamo se extiende basalmente a nivel

del quiasma óptico, adjunto a la lámina terminal al plano coronal justo posterior a los cuerpos mamilares, su borde superior es definido por el sulco hipotalámico entre el tálamo e hipotálamo y el margen lateral se extiende de los planos paramedianos-sagitales a través de los tractos olfatorios (Fig. 2 y 3) (Dudas, 2013).

Entre las principales funciones que desempeña el hipotálamo se incluyen su regulación del comportamiento, la respuesta autonómica y las respuestas endócrinas, así como también, su participación en al menos 6 funciones vitales en el organismo: 1) Presión sanguínea y control de los electrolitos vía núcleo paraventricular, 2) Metabolismo energético, vía ARC, núcleo paraventricular y área lateral hipotalámica, 3) Conductas reproductivas, vía área medial preóptica, ventromedial y núcleo ventral premamilar, 4) Temperatura corporal, vía región preóptica 5) Comportamiento defensivo, vía paraventricular, hipotálamo anterior, núcleo premamilar dorsal y el área lateral hipotalámica, 6) Ciclo circadiano, por el núcleo supraquiasmático, área lateral hipotalámica y el núcleo tuberomamilar (Hudspeth, Jessell, Kandel, Schwartz, & Siegelbaum, 2013).

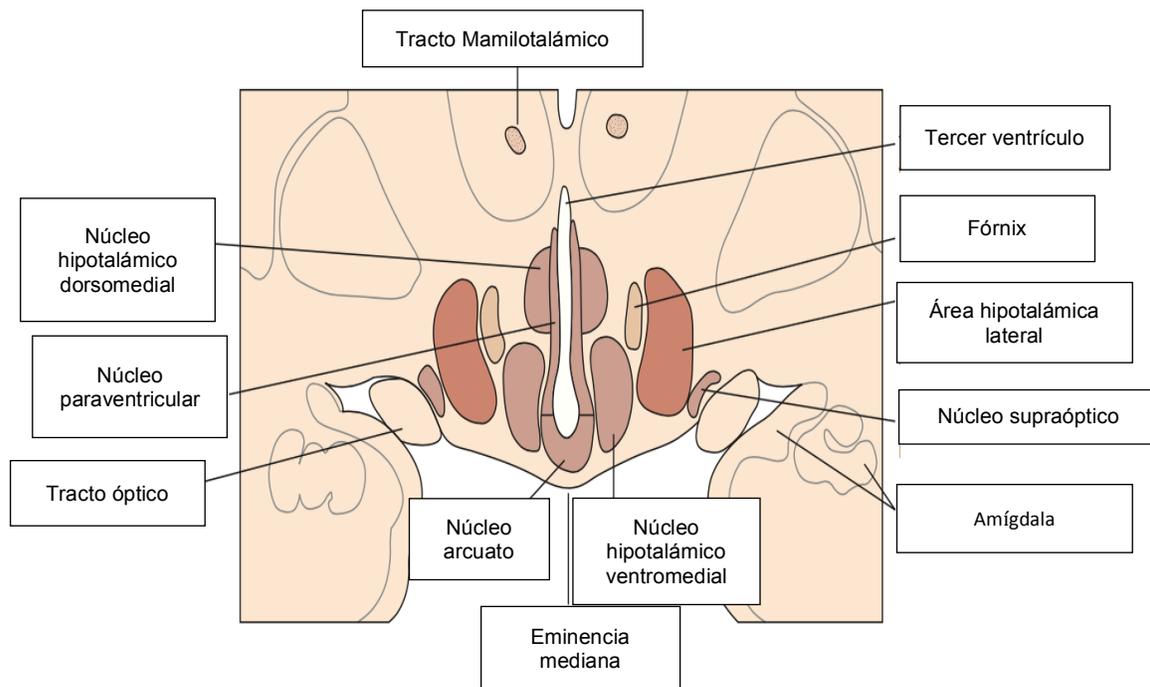


Figura 2. Estructura del hipotálamo, vista frontal del hipotálamo. Modificado de *Principles of Neural Science*, capítulo 47; Hudspeth, Jessell, Kandel, Schwartz, & Siegelbaum, 2013 (Hudspeth et al., 2013). Vista frontal del hipotálamo. El tercer ventrículo está en la línea media; los núcleos paraventricular, dorsomedial y arcuato están adyacentes al tercer ventrículo. El núcleo ventromedial es parte de la columna medial del hipotálamo y al lado se encuentra el hipotálamo lateral.

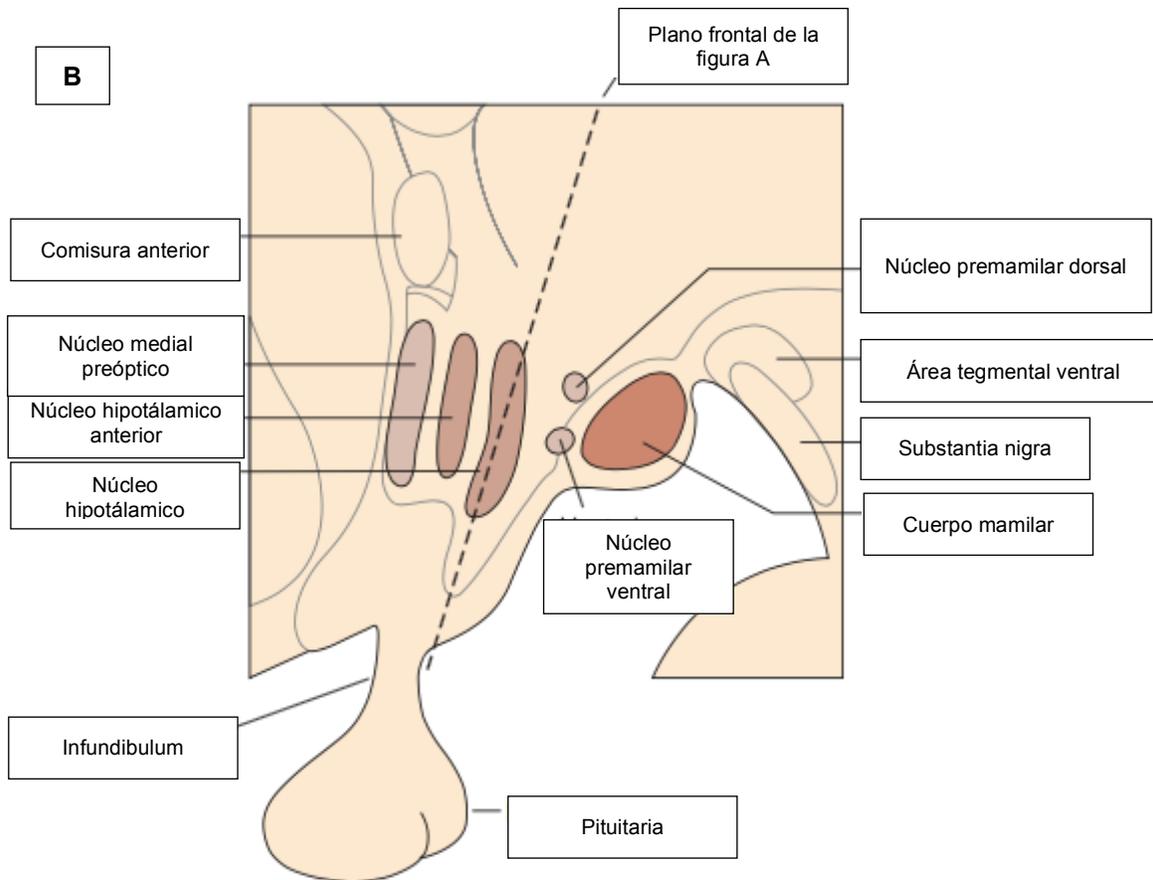


Figura 3. Estructura del hipotálamo, vista sagital del hipotálamo. Modificado de *Principles of Neural Science*, capítulo 47; Hudspeth, Jessell, Kandel, Schwartz, & Siegelbaum, 2013 (Hudspeth et al., 2013). Vista sagital del de la columna media del hipotálamo mostrando los núcleos de manera caudal y adyacente a la sustancia nigra y al área ventral tegmental del mesoencéfalo.

2.2.2 El metabolismo energético en el hipotálamo: Papel del núcleo arcuato

El hipotálamo se integra por múltiples núcleos que regulan la ingesta de alimento, denominados “centro de la saciedad”, conformados principalmente por el núcleo dorsomedial, el ventromedial, la porción medial del hipotálamo lateral, el núcleo premamilar y el núcleo arcuato (ARC) (Young & Polston, 2013). El ARC está localizado en la parte dorsal de la eminencia mediana y el tercer ventrículo del hipotálamo, además de que sus fibras proyectan al núcleo paraventricular y la región perifornical.

El ARC es nombrado en roedores y en humanos, también se conoce como núcleo infundibular (Young & Polston, 2013). En las ratas está compuesto de

100,000 neuronas en los machos y 86,000 en las hembras (Leal, Andrade, Paula - Barbosa, & Madeira, 1998). En humanos, ocupa un menor volumen, alcanzando tan sólo un $\frac{1}{4}$ del tamaño del núcleo ventromedial y sus límites son poco definidos, por lo que se desconoce el número preciso de neuronas que lo componen (Young & Polston, 2013). En su anatomía e integración con el resto del cerebro, el ARC tiene aferencias a la amígdala, al hipocampo y a la corteza entorrinal, y hacia el núcleo paraventricular (DeFalco et al., 2001). Quizá, una de las condiciones más relevantes en cuanto a la participación del ARC en la fisiología del cuerpo humano, obedece a que además de la integración sensorial a partir de sus aferencias sinápticas, el ARC se encuentra anatómicamente cercano a los capilares de la eminencia mediana, permitiéndole la integración de señales hormonales y metabólicas, que incluyen la leptina, insulina y ghrelina, ácidos grasos, aminoácidos y azúcares. Además, el ARC se implica en la plasticidad, neurogénesis en el adulto y sensibilidad a la leptina (Young & Polston, 2013).

A nivel molecular, el ARC está conformado por el sistema de neuronas melanocórticas, que pueden ser: 1) Orexigénicas: Estimulan la ingesta de alimentos y expresan neuropéptido Y (NPY)/Agouti-related protein (AgRP); 2) Anorexigénicas que inhiben la ingesta de alimentos (neuronas que expresan POMC (Proopiomelanocortina) y CART (Cocaine and Amphetamine Related Transcript) (Fig. 4) (Cone, 2005). Las neuronas NPY/AgRP del ARC expresan los receptores antagonistas a la proteína AgRP MC3R y MC4R (Cone, 2005). Se ha identificado a través de registros electrofisiológicos que los sistemas de neurotransmisión en las POMC/CART se componen de los neurotransmisores GABA y glutamato, y además expresan receptores a GABA (Fig. 4) (Cárdenas-Pérez & Camacho, 2016).

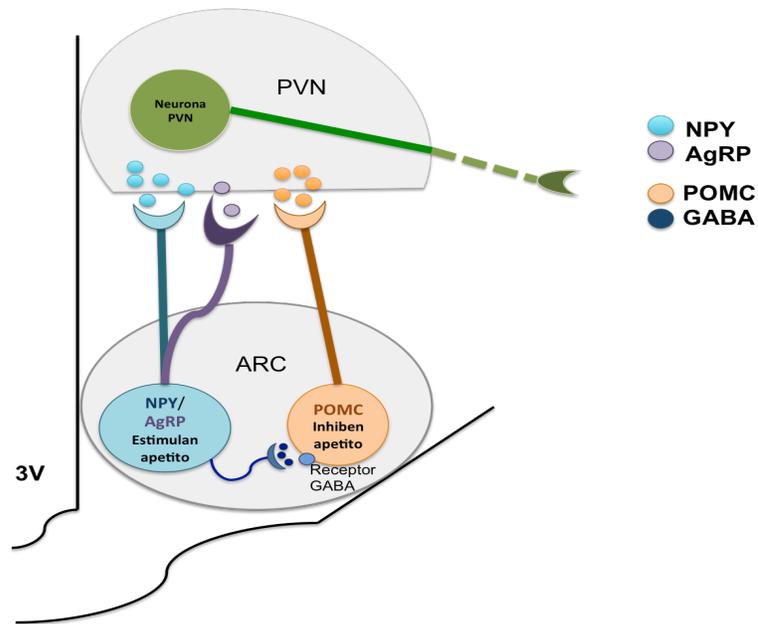


Figura 4. Las neuronas del núcleo arcuato (ARC). *Neuropéptido Y/Agouti related protein (NPY/AgRP) y Propiomelacórticas (POMC) y sus conexiones con el núcleo paraventricular (PVN), encargadas de estimular o inhibir el apetito. Modificado de Cárdenas-Pérez & Camacho (Cárdenas-Pérez & Camacho, 2016). En la figura se puede observar que en el núcleo arcuato se encuentran las neuronas NPY/AgRP y POMC y que éstas tienen proyecciones al núcleo PVN. A su vez, las neuronas NPY/AgRP liberan el neurotransmisor inhibitorio GABA inhibiendo la señal de POMC, estimulando el apetito.*

2.2.3 Integración hormonal del hipotálamo en la regulación del metabolismo energético corporal: Papel de la insulina, leptina y ghrelina

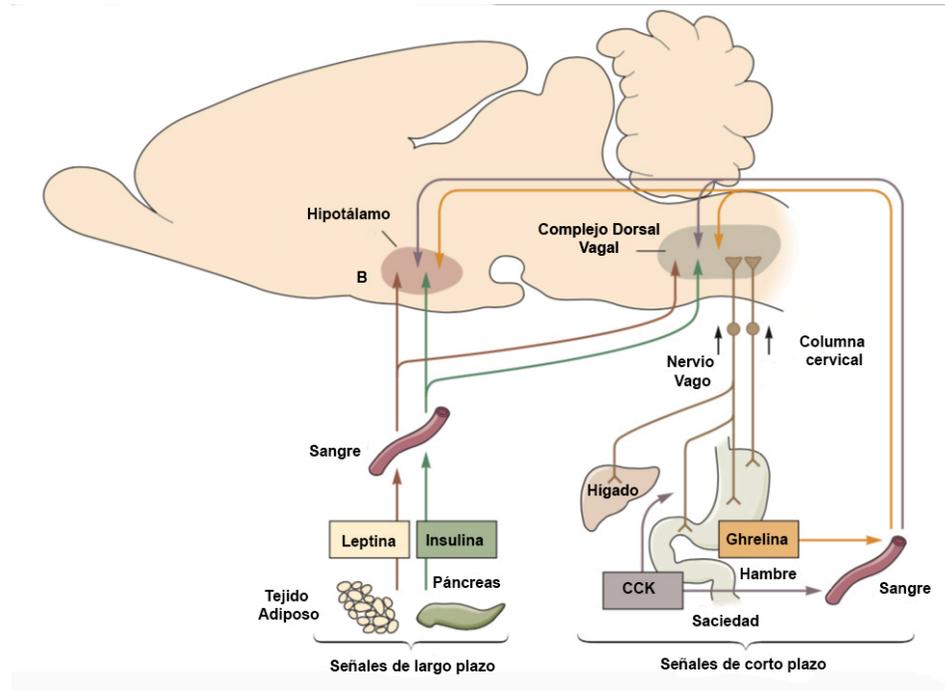


Figura 5. Mecanismos neurales y endocrinos del balance energético. Modificado de *Principles of Neural Science*, capítulo 49; Hudspeth, Jessell, Kandel, Schwartz, & Siegelbaum, 2013 (Hudspeth et al., 2013). Mantenimiento a corto y largo plazo. Señales a corto plazo: La ghrelina es liberada del estómago y su señal llega al cerebro promoviendo la alimentación. Por otro lado, la colecistoquinina (CCK) estimula el nervio vago promoviendo saciedad. Señales a largo plazo: La leptina e insulina informan al cerebro acerca del estado de los depósitos de grasa. La leptina es producida por el tejido adiposo, mientras que la insulina por el páncreas. Estas hormonas son sensadas por sus receptores en el núcleo arcuato como por sus receptores del complejo dorsal vagal, reduciendo el consumo de alimento e incrementando el gasto energético.

El hipotálamo está implicado en la integración de señales periféricas de naturaleza hormonal que le informan el estado metabólico y energético del cuerpo (Fig. 5). Entre las hormonas más importantes en este contexto son:

Insulina

Es una hormona peptídica anabólica producida por las células beta de los islotes pancreáticos que reduce la ingesta de alimentos y peso corporal, regulando el metabolismo de carbohidratos (Fig. 5). Los receptores a insulina se expresan en

todo el SNC y son abundantes en el ARC (Cone, 2005). La respuesta de insulina dentro de la célula comienza cuando la insulina se une al receptor de insulina (IR) o al insulin-like growth factor 1 (IGFR1); y activa diversos procesos celulares a través de la vía PI3K/AKT/mTOR/AMPK (Fig. 5 y 6 A) (Boucher, Kleinridders, & Kahn, 2014). La activación de la señal de PI3K por insulina se ha identificado en el ARC y está relacionada con la inhibición del consumo de alimento (Varela & Horvath, 2012) a través del incremento en la expresión de NPY y AgRP (Cone, 2005).

El receptor de insulina es un tipo de receptor de tirosina cinasa, en el cual el ligando dispara una autofosforilación de residuos de tirosina. La adición de grupos fosfato genera un sitio de unión para el sustrato de receptor de insulina (IRS-1), el cual se activa fosforilándose (Boucher et al., 2014). La activación de IRS-1 inicia la transducción de señales y se une a PI3K activándola (Boucher et al., 2014). Esto luego cataliza la conversión de fosfatidilinositol 4-5-bisfosfato en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (IP3). IP3 actúa como segundo mensajero e induce la activación de diferentes cinasas como AKT que dispara la translocación del transportador de glucosa GLUT4, facilitando la difusión de glucosa a la célula (Boucher et al., 2014)

Leptina

Su nombre viene del griego leptos (λεπτός) que significa delgado, es una hormona peptídica producida principalmente por el tejido adiposo que ayuda a regular el balance de energía suprimiendo el hambre (Fig. 5) (Baskin, 2015). Sus receptores LepR se encuentran principalmente en las neuronas NPY y POMC del ARC (Baskin, 2015).

La leptina actúa a través de los receptores LepR activando la proteína JAK y STAT3 en las neuronas NPY/AgRP y en las POMC, así inhibe la expresión de NPY y AgRP por medio de la señal de PI3K (Fig. 6 A) (Baskin, 2015). El resultado final de la integración hipotalámica de la leptina es la supresión del consumo de alimento.

Ghrelina

La ghrelina es un péptido de 28 aminoácidos principalmente sintetizado en el estómago y es secretado a la circulación (Stark & Andrews, 2014). La ghrelina es un potente estimulador de la liberación de la hormona de crecimiento y potencia la ingesta de alimentos y la ganancia de peso para regular la homeostasis energética (Stark & Andrews, 2014).

Su receptor blanco principalmente es el GHSR1a, que tiene una máxima expresión en el ARC en las neuronas orexigénicas AgRP en aproximadamente un 94% y en las neuronas anorexigénicas POMC se expresa en menos de un 8% (Stark & Andrews, 2014). La ghrelina estimula la actividad de las neuronas NPY y AgRP y se conoce que la ablación genética de AgRP en la etapa adulta evita los efectos orexigénicos de la ghrelina (Stark & Andrews, 2014).

El receptor de ghrelina está acoplado principalmente a la proteína $G\alpha_{q/11}$, la cual activa la fosfolipasa C y conduce a la generación de dos mensajeros secundarios: el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) (Mokrosiński, Madsen, & Holst, 2014). El IP3 liberado en el citoplasma puede luego inducir señalización por Ca^{2+} que a su vez pueden fosforilar al elemento de respuesta a unión de proteína (CREB) (Fig. 6 A) y también puede inducir a la vía de señalización de Rho GTPasa resultando en la activación del elemento de respuesta a suero (SER) (Fig. 6 A) (Mokrosiński et al., 2014).

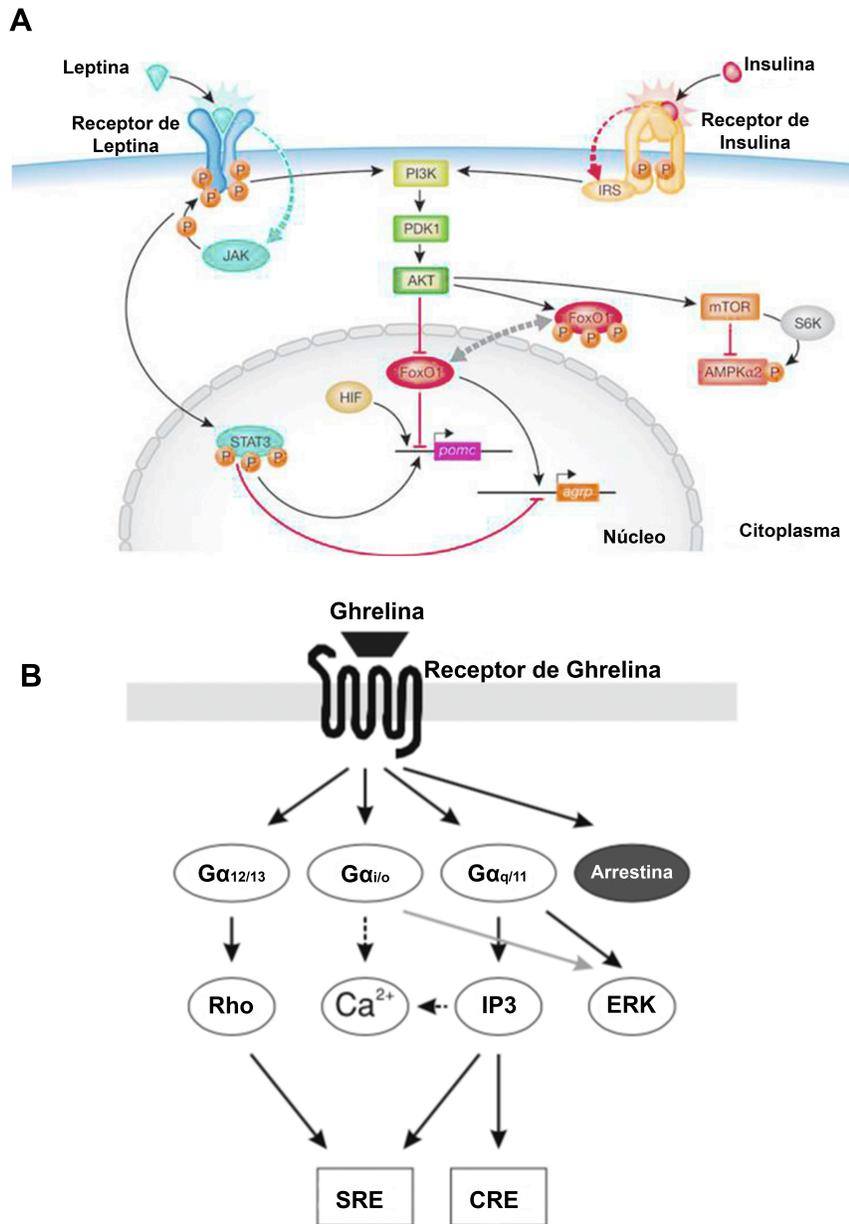


Figura 6. Hormonas y receptores que regulan el metabolismo energético. A) Vías activadas por la acción de la insulina y leptina en el ARC. B) Vías activadas por la acción de la ghrelina. Modificado de Varela & Horvath, 2012 y Mokrosinski, Madsen & Holst 2014 (Mokrosiński et al., 2014; Varela & Horvath, 2012). Insulina: La activación de IRS-1 inicia la transducción de señales y se une a PI3K activándola. Esto luego cataliza la conversión de fosfatidilinositol 4-5-bifosfato en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (IP3). IP3 actúa como segundo mensajero e induce la activación de diferentes cinasas como AKT. Leptina: La leptina actúa a través de los receptores LepR activando la proteína JAK y STAT3 en las neuronas NPY/AgRP y en las POMC, así inhibe la expresión de NPY y AGRP por medio de la señal de PI3K. Ghrelina: está acoplado principalmente a la proteína

$G\alpha_{q/11}$, la cual activa la fosfolipasa C y conduce a la generación de dos mensajeros secundarios: el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP3).

2.3 La lipotoxicidad es un mecanismo patogénico que genera daño metabólico en órganos claves para el desarrollo de DMT2

El desarrollo de obesidad requiere un estado de balance energético positivo principalmente relacionado con el incremento del tejido adiposo. Sin embargo, aún no está del todo claro por qué la expansión del tejido adiposo en personas con obesidad está fuertemente asociada con la generación de resistencia a la insulina y DMT2. Una de las hipótesis que trata de explicar este vínculo difícil de entender, propone que durante la obesidad se altera la capacidad de expansión y función del tejido adiposo promoviendo el flujo de ácidos grasos de los adipocitos y su acumulación en el plasma incrementando la susceptibilidad al deterioro metabólico (Carobbio, Rodriguez-Cuenca, & Vidal-Puig, 2011).

En este contexto, las alteraciones en el perfil de lípidos en el plasma de humanos con obesidad pueden reproducirse en modelos animales con obesidad genética (*ob/ob*) u obesidad inducida por una dieta alta en grasa (Lee et al., 2001). El uso de estos modelos animales ha sugerido que el escape de los lípidos del tejido adiposo y la acumulación ectópica de ceramidas, acilcarnitinas, diacilgliceroles y de ácidos grasos saturados genera daño tisular en órganos metabólicamente relevantes, incluyendo, el músculo esquelético, el hígado, las células beta del páncreas, el miocardio y el cerebro, un evento que se le ha denominado lipotoxicidad (Carobbio et al., 2011). La lipotoxicidad se asocia a la activación de estrés del retículo endoplásmico, la disfunción mitocondrial e inflamación en tejidos implicados en la homeostasis metabólica, incluyendo las células beta pancreáticas, el músculo esquelético y cardiaco. La afección en estos sistemas puede inducir la generación de resistencia a la insulina y el desarrollo de DMT2 (Cnop, 2008; Porte & Kahn, 2001). Quizá el mejor ejemplo del daño lipotóxico tisular asociado al incremento en los niveles de lípidos en sangre provenga de los sujetos que presentan lipodistrofia, los cuales son incapaces de

formar tejido adiposo y por lo tanto no pueden almacenar lípidos en este órgano, promoviendo la fuga de los mismos y su acumulación en órganos periféricos. El incremento de lípidos en la sangre de los lipodistróficos correlaciona con la presencia de cardiomiopatía, hígado graso, resistencia a la insulina, etc, todas ellas son características presentes en el síndrome metabólico y diabetes (Robbins & Savage, 2015). De interés, la lipotoxicidad también puede ocurrir en el SNC, tal y como se ha observado en diversas enfermedades neurodegenerativas (Eizirik, Cardozo, & Cnop, 2007).

En su conjunto, defectos en el almacenaje de lípidos en el tejido adiposo dan lugar a la fuga y acumulación ectópica en órganos metabólicamente relevantes en el control de energía, favoreciendo el desarrollo de daño tisular y generando obesidad y DMT2. Consideramos que el SNC puede ser un blanco para mostrar daño celular inducido por lipotoxicidad en el contexto de obesidad o incremento de ingesta calórica. Sin embargo, también es importante mencionar que el grado de daño lipotóxico es dependiente de la especie de lípido acumulada en el sistema, lo cual describiremos a continuación.

2.3.1 Generación de lípidos lipotóxicos: Síntesis de ceramidas

El metabolismo de los esfingolípidos es controlado por una red compleja de vías interconectadas que llevan a la producción de moléculas bioactivas (Samad, Badeanlou, Shah, & Yang, 2011). La ceramida es la molécula principal en el metabolismo de esfingolípidos y el precursor común. Su producción puede ser mediada por la síntesis *de novo* por la enzima palmitoil transferasa (SPT) y la ceramida sintasa (CerS) o la hidrólisis de la esfingomielina de la membrana por la enzima esfingomielinasa (Samad et al., 2011).

La síntesis de esfingolípidos *de novo* comienza con la condensación de la serina y la palmitoil-coenzima A por la enzima SPT para formar 3-cetodihidroesfingosina (Brice & Cowart, 2011). Esta enzima, que se localiza en el RE, existe como un multímero de 480kDa compuesto por un conjunto de 4 dímeros (Brice & Cowart, 2011). Las reacciones siguientes son catalizadas por 3-

cetoesfingosina reductasa, las ceramida sintasas y las dihidroceramidas desaturadas (Benjamin T. Bikman & Summers, 2011).

Esta vía puede ser inducida por eventos inflamatorios que se encuentran sobrerregulados en la obesidad y el consumo de dieta alta en grasa, provocando resistencia a insulina (Benjamin T. Bikman & Summers, 2011). Sin embargo, inhibidores de la síntesis de novo de ceramidas, como la miriocina pueden proteger en contra de la resistencia a insulina en ratas diabéticas Zucker (Benjamin T. Bikman & Summers, 2011). Los ácidos grasos proinflamatorios como el ácido palmítico pueden modificar las tasas de síntesis y degradación de ceramidas, incrementado su producción (William L. Holland et al., 2011). Por lo tanto, las ceramidas propician la inflamación que a su vez inhibe la acción de la insulina, desencadenando DMT2 (William L. Holland et al., 2011).

También se sabe que las ceramidas inhiben la acción de AKT por dos mecanismos: El primero promueve su desfosforilación vía la proteína fosfatasa 2A, la cual es blanco directo de los esfingolípidos y el segundo previene la translocación de AKT vía PKC ζ (Benjamin T. Bikman & Summers, 2011). Las ceramidas inhiben también la señal dependiente de insulina hacia AKT (Benjamin T. Bikman & Summers, 2011). Las ceramidas también pueden alterar la dinámica bioenergética de la mitocondria, ya que afectan la cadena transportadora de electrones y aumentan las especies reactivas de oxígeno. Modelos *in vivo* han apoyado esto concluyendo que la inhibición de síntesis de ceramidas mejora la función mitocondrial (Ussher et al., 2010).

2.3.2 Ceramidas, diacilgliceroles y lípidos saturados: Especies de lípidos clave en el desarrollo de daño lipotóxico tisular asociado a la generación de diabetes

El efecto lipotóxico que manifiesta la acumulación de lípidos específicos en los órganos del cuerpo durante la obesidad, se determina en gran medida debido a que cada órgano posee su propio perfil de lípidos, con ello, cambios selectivos en las especies de lípidos en diferentes órganos pueden ser relevantes en el desarrollo de lipotoxicidad. En este contexto, se conoce que de manera fisiológica

las ceramidas de tipo C18:0 son esenciales para el desarrollo cerebelar y las C22:0–24:0 modulan la función hepática (Ginkel et al., 2012; Pewzner-Jung et al., 2010). Mientras que los diacilgliceroles y los lípidos saturados participan en procesos de señalización intracelular en muchos tipos celulares del cuerpo (Chakraborty & Jiang, 2013).

En trabajos previos, se ha identificado el perfil lipidómico en modelos de obesidad y su contribución a la disfunción neuronal (Camacho et al., 2013; Camacho et al., 2012; Delint-Ramirez et al., 2015). En esos estudios se ha propuesto que los lípidos difieren en su grado de toxicidad, exponiendo que ciertas especies como las ceramidas, diacilgliceroles y lípidos saturados promueven efectos más tóxicos que los triacilglicéridos. Por ejemplo, se conoce que la incubación de los islotes beta del páncreas con ácidos grasos saturados de cadena larga y ceramidas, inducen la apoptosis de sus células favoreciendo el desarrollo de diabetes (Unger & Scherer, 2010).

Por su parte, en humanos con sobrepeso y obesidad se ha demostrado la acumulación de ceramidas (C:20 y C:22) y de ácidos grasos saturados de cadena larga en el músculo esquelético lo que correlaciona con la presencia de diabetes (de la Maza et al., 2015). De hecho, biopsias de hígado de mexicanos con obesidad diagnosticados con enfermedad hepática presentan acumulación de triacilglicéridos (León-Mimila et al., 2015). Asimismo, se ha reportado un incremento del 76% y 83% en las ceramidas C16:0 (1 vs 4 μ M) y C20:0 (0.1 vs 0.65 μ M) en el músculo de sujetos con obesidad cuando se compara con humanos delgados, respectivamente (Adams et al., 2004; Drobnik et al., 2003). También se ha reportado que hay un incremento en ceramidas en el plasma de personas con hepatoesteatosis no relacionada con el alcohol (Anjani et al., 2015).

Algunos reportes han asociado a las especies C:24 con resistencia a insulina y diabetes (Kasumov et al., 2015; Rico, Bandaru, Dorskind, Haughey, & McFadden, 2015). Por su parte, la administración venosa de ácidos grasos saturados libres a humanos produce resistencia a la insulina en el músculo

(Szendroedi et al., 2012). De esta forma, la evidencia demuestra claramente el papel selectivo de los lípidos en el desarrollo de toxicidad, la cual también depende del tejido seleccionado. Una de las probables razones de este efecto se debe a que la acumulación de triacilglicéridos en los órganos genera nuevas especies de metabolitos que llegan a ser tóxicas, incluyendo, acilcarnitinas, ácidos grasos saturados de cadena larga, ceramidas, y/o diacilglicerol (William L Holland et al., 2007; Watson, Coghlan, & Hundal, 2009).

Las alteraciones en el perfil de lípidos identificadas en el plasma de humanos con obesidad pueden reproducirse en modelos animales con obesidad genética (*ob/ob*) u obesidad inducida por la ingesta de dieta alta en grasa. Los datos demuestran que las personas con obesidad exhiben un incremento del 86% en los niveles plasmáticos de ceramida C18:0, y en menor grado, el incremento específico de triglicéridos que incluyen la 16:0/16:0/18:1 y 16:0/18:1/18:0 (Kotronen et al., 2009). Por otro lado, en músculo de pacientes, la resistencia a insulina fue caracterizada por altos niveles de esfingolípidos C18:0 y en plasma, los diacilglicéridos y ésteres de colesterol (T. et al., 2016). Además, análisis cuantitativos tanto en ratones con HFD o en humanos con DMT2, han determinado que las dihidroceramidas podrían ser biomarcadores de DMT2 (Wigger et al., 2017).

Por su parte, los resultados mostrados en modelos animales de obesidad genética evidenciaron un incremento del 40% en los niveles de triacilglicerol (valores de 18 mM) y un 25% en ácidos grasos saturados de cadena larga (valores 1 μ M) (Ussher et al., 2010). Por otro lado, la dieta alta en grasa en ratones generó un incremento plasmático de 284% en ceramida C20 (valores de 0.026 μ M), y de C14, C16, C18 (valores de 0.26, 0.08, 0.04 μ M, respectivamente). En este mismo modelo, se observó un incremento del 100% en los niveles de triglicéridos (valores 20 mM), ácidos grasos de cadena larga (valores de 5 μ M), ceramidas (valores 140 μ M), y diacilglicerol (600 μ M) en el músculo (Shah et al., 2008). Además, la acumulación del lípido saturado, ácido

palmítico, en el corazón de ratones transgénicos generó apoptosis de los cardiomiocitos y muerte prematura (Lee et al., 2004). Finalmente, la acción lipotóxica también puede reproducirse en cultivo de células, por ejemplo, la incubación de células de músculo y miocitos de humano con acilcarnitinas o con el lípido saturado palmítico, decrece la sensibilidad a insulina y la captura de glucosa (Aguer et al., 2015).

En su conjunto, la obesidad en humanos y en modelos animales con obesidad genética o por dieta, demuestran que el incremento en los niveles de triacilglicéridos, ceramidas y ácidos grasos saturados en plasma correlaciona con defectos de la homeostasis energética y susceptibilidad a la muerte celular.

2.4 El estrés del retículo endoplásmico y la disfunción mitocondrial son mecanismos de daño lipotóxico en el sistema nervioso activados durante la obesidad

2.4.1 Activación del estrés de RE en la obesidad propicia el desarrollo de DMT2

El RE es el organelo responsable de la biosíntesis, plegamiento, ensamble y modificación de proteínas, y de la biosíntesis de lípidos (Cárdenas-Pérez & Camacho, 2016). Bajo condiciones fisiológicas y patológicas, las células incrementan su demanda de plegamiento de proteínas, acumulándose agregados de proteínas en el lumen del RE y promoviendo la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) con la finalidad de restaurar el plegamiento correcto de proteínas y la homeostasis celular (Cárdenas-Pérez & Camacho, 2016). Sin embargo, el incremento de proteínas mal plegadas en el RE produce estrés, que puede censarse por un selecto grupo de proteínas de membrana llamados: IRE, PERK y ATF6. Tanto Ire1 α e Ire1 β cortan el ARNm de la proteína de unión X-Box (XBP1) generando splicing XBP1 (sXBP1) (Cárdenas-Pérez & Camacho, 2016). El propósito final de la activación de estas cascadas de señalamiento es la reducción de la síntesis general de proteínas y el buen plegamiento de las ya formadas

mediante la participación de las chaperonas, entre las que destacan, la GRP78 (BIP), Heat Shock Protein A5 (HSPA5) disulfido isomerasa (PDI), calnexina (CANX), calreticulina (CALR) y GRP94 (Cárdenas-Pérez & Camacho, 2016).

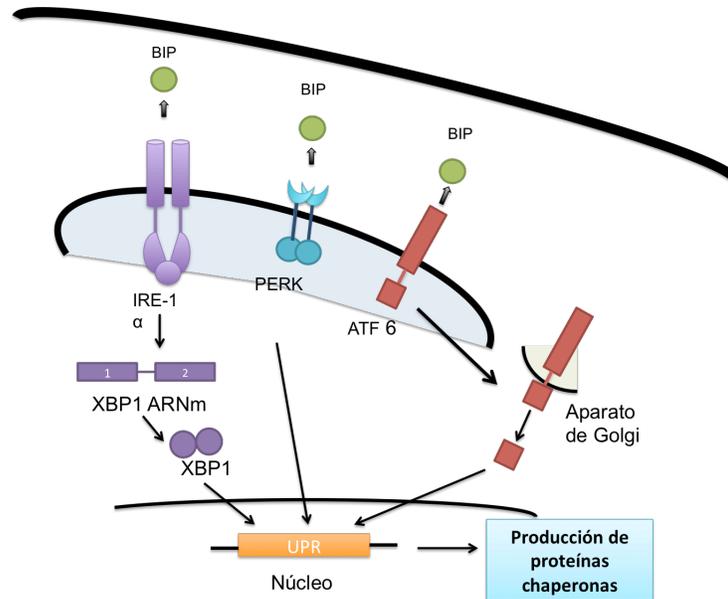


Figura 7. Cascada de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y de estrés de RE. Al aumentar el flujo de proteínas malplegadas al RE, la proteína chaperona BIP se libera de IRE-1 α , PERK y ATF6, permitiendo que actúen como factores de transcripción permitiendo la producción de proteínas chaperonas que ayudan al plegamiento de las proteínas. En condiciones de estrés prolongado, el objetivo de la respuesta UPR pasa de la supervivencia celular a uno que lleve a la apoptosis. Modificado de Cárdenas-Pérez y Camacho (Cárdenas-Pérez & Camacho, 2016).

En el contexto de obesidad, se ha demostrado que el desarrollo de la resistencia a insulina es inducida por el estrés de RE que dispara la actividad de JNK a través de IRE1a (Hotamisligil, 2010). La activación de JNK está también relacionada con respuestas inflamatorias junto con el complejo IKK, permitiendo la activación de la vía de NF-KB que tiene un papel importante en la apoptosis (Hotamisligil, 2010). Los genes transcritos por NF-KB incluyen citocinas proinflamatorias y enzimas involucradas en inmunomodulación, como la ciclooxigenasa (Kawasaki, Asada, Saito, Kanemoto, & Imaizumi, 2012). Así, la inflamación inducida por el estrés de RE exacerba patologías como la DMT2 y la obesidad.

Empleando modelos *in vitro* también se ha demostrado que el estrés del RE está ligado a la lipotoxicidad y a la apoptosis; por ejemplo las células β expuestas crónicamente a elevadas concentraciones de ácidos grasos libres (AGL) incrementan la expresión de los ARNm de ATF4, CHOP y HSPA5 (Biden, Boslem, Chu, & Sue, 2014). También existe potencial de producir estrés del RE por parte de los AGL en adipocitos, músculo esquelético, miocitos, hepatocitos y neuronas hipotalámicas (Cárdenas-Pérez & Camacho, 2016). Además, en modelos animales de obesidad como el ratón ob/ob, se ha reportado la presencia de la regulación a la alta de los marcadores de estrés de RE como la HSPA5, PERK fosforilado y eIF2a fosforilado, tanto en el hígado como tejido adiposo (Biden et al., 2014; Kawasaki et al., 2012). Finalmente, la obesidad inducida por la ingesta de dietas altas en grasa o de obesidad genética en ratas y ratones, se ha identificado el incremento de ceramidas, diacilglicerol, colesterol, induciendo la activación y expresión de PERK, IRE1a, HSPA5, CHOP, Xbp1s, ATF4 y un decremento en la fosforilación de STAT3, resistencia a leptina e inflamación en el hipotálamo (Borg, Omran, Weir, Meikle, & Watt, 2012) (Cárdenas-Pérez & Camacho, 2016). Además, la inducción de lipotoxicidad por el PAL en neuronas de hipotálamo, promueve estrés de RE y apoptosis atenuando la señal de insulina (Mayer & Belsham, 2010). De interés, este efecto puede ser revertido con la administración de ácidos grasos no saturados, en parte, por decrecer la inflamación hipotalámica (Cintra et al., 2012).

Con ello, la lipotoxicidad asociada al incremento de lípidos correlaciona con la activación de ER modulando la sensibilidad a la insulina en diversos tipos celulares.

2.4.2 La lipotoxicidad durante la obesidad altera la dinámica y función mitocondrial

La mitocondria es el organelo mayormente involucrado en la síntesis de ATP, a través de su acción en el proceso de fosforilación oxidativa. Las alteraciones en la función mitocondrial también se asocian a la activación del estrés oxidativo, generando un aumento de ROS que puede generar peroxidación de lípidos, como

el 4-HNE (4-hidroxinonenal) y daño al ADN (Bournat & Brown, 2010; Montgomery & Turner, 2015). Diversas investigaciones han mostrado que en los individuos obesos con resistencia a la insulina hay disfunción mitocondrial, disminución en el metabolismo de los lípidos y una actividad enzimática reducida (Bournat & Brown, 2010; Montgomery & Turner, 2015). Además, empleando modelos animales basados en dietas hipercalóricas ha sido posible identificar el daño oxidativo en el tejido adiposo a través de la peroxidación de los lípidos, mediante la supresión de genes relacionados con glutatión (Johnson et al., 2016). Investigaciones en pacientes con DMT2 han reportado un aumento de malondiadehído (MDA) un marcador de estrés oxidativo (Das, Biswas, Mukherjee, & Bandyopadhyay, 2016). Lo anterior ha propuesto que la disfunción mitocondrial causada por la lipotoxicidad puede incrementar la susceptibilidad a la DMT2 (Bournat & Brown, 2010). Sin embargo, todavía no queda muy claro si la disfunción mitocondrial es consecuencia o causa de la resistencia a la insulina (Lytton, Westlin, & Hanley, 1991) (Fig. 8).

Adicionalmente, los efectos deletereos de la lipotoxicidad en el contexto de obesidad pueden desregular la interacción del RE y la mitocondria. El RE y la mitocondria interactúan metabólicamente y funcionalmente a través de uniones entre sus membranas conocidas como membranas asociadas a mitocondrias (MAMs) (Rowland & Voeltz, 2012). Su función se ha relacionado con el transporte de fosfolípidos del RE a la mitocondria, una respuesta celular entre el RE y mitocondria, y la sobrevivencia y con la muerte celular. Las MAMs constituyen un microdominio que recluta diversas proteínas de importancia funcional, entre ellas: 1) Enzimas que participan en la síntesis de lípidos: la colesterol aciltransferasa, diacilglicerol aciltransferasa y fosfatidilserina sintasa; 2) proteínas que regulan el calcio: el receptor inositol-1,4,5-tris-fosfato (IP3R), el receptor de ryanodina (RyR), el canal mitocondrial dependiente de voltaje anión (VDAC1) y el receptor sigma-1 (SigR1); 3) proteínas que participan en el plegamiento de proteínas: calnexina (CNX) y ERO1; 4) proteínas involucradas en el remodelamiento por la fusión y fisión de las mitocondrias: dynamin-like 1 (DRP1) y las mitofusinas 1 y 2 (MFN 1 Y

2) y 5) proteínas que estabilizan la unión al RE: PACS2 (Fig. 8) (Rowland & Voeltz, 2012).

La integración funcional del RE-mitocondria a través de las MAMs permite regular la homeostasis de Ca^{2+} en la célula y acoplar este proceso con la síntesis de basal de ATP (Rowland & Voeltz, 2012). En este sentido, en condiciones basales la participación activa del RE y la mitocondria mantiene las concentraciones de Ca^{2+} en el citosol (del orden de 100 nM Ca^{2+} libre respecto a los 100 mM en el espacio extracelular). El Ca^{2+} del citosol se captura al RE por la acción de la bomba SERCA y se secuestra por moléculas amortiguadoras como la calsecuestrina (Rowland & Voeltz, 2012). En condiciones de estimulación, el Ca^{2+} se libera del RE por el RyR, activado por concentraciones muy bajas de Ca^{2+} citosólico, o bien mediante los receptores IP3R en respuesta a señales de fostatidilinositol, que se produce cuando las concentraciones de Ca^{2+} son bajas (Rowland & Voeltz, 2012). El Ca^{2+} liberado a través del IP3R fluye a la matriz mitocondrial a través de la proteína uniportadora de calcio mitocondrial (MCU), activando las deshidrogenasas mitocondriales que son una pieza clave en la producción de ATP.

La dinámica entre RE-mitocondrial se regula en gran parte por la participación de las mitofusinas, creando un microdominio que facilita la fusión mitocondrial (Archer 2013). Se ha demostrado que la interacción entre el RE y la mitocondria se regula por la acción de las MFN 1 y 2 (Rowland & Voeltz, 2012). De hecho, las proteínas MFN 1 y 2, la PTEN y PML y la ERO1 incrementan la salida de calcio del RE a la mitocondria, ya sea por fosforilación o por interacción con IP3R (Rowland & Voeltz, 2012). Durante el proceso de fusión las proteínas involucradas son DRP1, que permite la fisión de la membrana mitocondrial externa y S-OPA1 que permite la fragmentación de la membrana interna (Wai & Langer, 2016) (Fig 7B). Interesantemente, el decremento de calcio a nivel del RE da lugar a la activación del estrés del RE que incluye cambios morfológicos y aumento de las uniones entre RE-mitocondria promoviendo incremento en la actividad mitocondrial. Defectos en proteínas del microdominio de las MAMs promueven estrés del RE previo al desarrollo de disfunción mitocondrial (Kim, Wei, & Sowers,

2008). De esta manera, es posible que alteraciones en la conformación de las MAMs den lugar a alteración en la homeostasis de calcio o daño metabólico asociado al estrés del RE induciendo disfunción mitocondrial. En este contexto, la depleción de la MFN2 en ratas y ratones promueve resistencia a insulina y disfunción mitocondrial, esto relacionado al incremento de estrés de RE en el músculo esquelético (Kim et al., 2008; Nie et al., 2014) y en el hígado (Sebastián et al., 2012; Zorzano, Hernández-Alvarez, Sebastián, & Munoz, 2015). Evidencia experimental ha apoyado tal propuesta mostrando que pacientes obesos exhiben decremento en la expresión de la MFN2 (Bach et al., 2003) y pacientes con DMT2, muestran disfunción en la fusión mitocondrial, por disminución de la expresión de Mfn2 y disminución del tamaño mitocondrial (Zorzano, Liesa, & Palacín, 2009). Adicionalmente, empleando modelos animales se demostró que ratones knock-out específicos para la proteína Opa1 en las células β del páncreas, exhiben alteración en la secreción de insulina causando hiperglicemia (Zhang et al., 2011).

Por su parte, en modelos de obesidad inducida por dieta alta en grasa en ratones carentes de la MFN2 en las neuronas POMC anorexigénicas del hipotálamo, se ha demostrado disminución de los contactos entre RE-mitocondria resultando en estrés del RE, resistencia a leptina y gasto energético reducido (Schneeberger et al., 2013). Contrariamente, la obesidad inducida por dieta alta en grasa en ratones que carecen de la MFN1 y MFN2 en neuronas AgRP orexigénicas del hipotálamo, promueve disminución de los contactos entre RE-mitocondria, obesidad e incremento de grasa parcial (Dietrich, Liu, & Horvath, 2013). Además, se ha demostrado que en ratones obesos existen cambios en la expresión de Mfn2 en el ARC, esto mediado por el ácido palmítico (PAL) que activa la respuesta de estrés de RE y promueve susceptibilidad a la resistencia a insulina (Díaz et al., 2015).

Finalmente, se ha reportado que el aumento de los contactos entre RE y mitocondria coordinados por la MFN2 durante la obesidad, incrementan el flujo de Ca^{2+} del RE a la mitocondria a través de los receptores a IP3R generando disfunción mitocondrial, activación de la vía JNK y la resistencia a insulina (Arruda et al., 2014). Nuestro artículo recientemente aceptado apoya tal evidencia

demostrando que la lipotoxicidad inducida por la ingesta de dieta calórica induce incremento en los contactos entre RE-mitocondria y flujo de calcio intramitocondrial (Cardenas-Perez et al., 2018) . De hecho, se ha reportado que la DMT2 altera los transientes de Ca^{2+} por medio de alteraciones de la actividad de la SERCA (Sheikh et al., 2012). Adicionalmente, el calcio además se implica en la señalización molecular, ligando la función del RE y la mitocondria, así el Ca^{2+} en la mitocondria está involucrado en la producción de energía y determina el destino celular, disparando o previniendo la apoptosis (Contreras, Drago, Zampese, & Pozzan, 2010). Así, parece ser que las MAMs coordinan estrechamente el metabolismo energético a través de sus efectos sobre la homeostasis de calcio, la activación del RE y la función mitocondrial, procesos moleculares que se comprometen durante la lipotoxicidad inducida por el incremento de lípidos durante la obesidad.

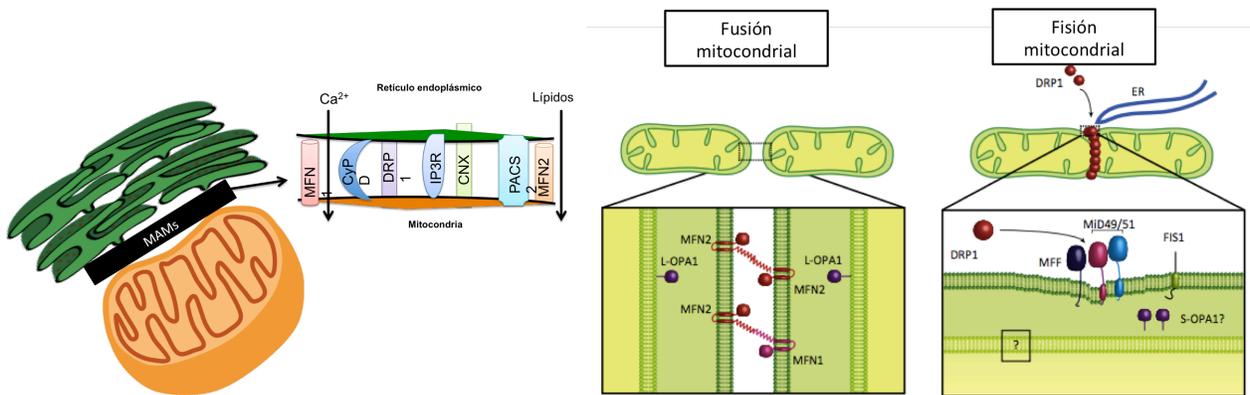


Figura 8. Las membranas asociadas a mitocondrias (MAMs) y los procesos de dinámica mitocondrial: Fusión y fisión. A) Las MAMs son un microdominio conformado por diferentes proteínas que se encargan de la homeostasis de calcio (IP3R), el transporte de lípidos, plegado de proteínas (CNX, CyPD), la supervivencia y muerte celular y la morfología mitocondrial (MFN 1 Y 2, DRP 1). Estas proteínas están ligadas a la morfología del RE y mitocondria, además participan durante la respuesta de UPR. **B)** La dinámica de la mitocondria es regulada por la fusión y fisión, en estos procesos se involucran las proteínas L-OPA1, MFN1 y MFN2 para la fusión y DRP1, MFF. La morfología mitocondrial está entrelazada con las necesidades metabólicas de las células. Modificado de Cárdenas-Pérez y Camacho 2016 y Wai y Langer 2016 (Cárdenas-Pérez & Camacho, 2016; Wai & Langer, 2016).

2.5 La programación materna por ingesta de dietas hipercalóricas y obesidad fomenta alteraciones metabólicas y conductuales en la descendencia

Como se expuso inicialmente, entender las causas precisas que han conducido al incremento explosivo de obesidad-sobrepeso en nuestra sociedad y el desarrollo de desórdenes metabólicos y de carácter en la descendencia son diversas y entender la relación causa-efecto puede ser complejo. Se ha propuesto que una de las causas de dichas alteraciones puede tener sus orígenes durante el desarrollo embrionario, modulando, entre otras rutas, la función-estructura del sistema nervioso. En este sentido, estímulos del medio ambiente durante la periconcepción, la gestación y la lactancia modulan el desarrollo de los individuos, conduciendo a la predisposición a enfermedades durante etapas posteriores de la vida (Barker, 1990).

En el 2007, Nathanielsz y cols propusieron los diez principios de la programación durante el desarrollo en modelos animales, donde se destaca que

existen periodos críticos de vulnerabilidad embrionaria a condiciones subóptimas y sus consecuencias tienen efectos que alteran respuestas en etapas posteriores de la vida (Nathanielsz, Poston, & Taylor, 2007) (Tabla 1). Así, con el desarrollo de estas investigaciones ha quedado claro que hay una relación del ambiente, la nutrición y la susceptibilidad a patologías en la descendencia.

| Los diez principios de la programación propuestos por Nathanielsz y colaboradores |
|--|
| <p>1. Durante el desarrollo, hay periodos críticos de vulnerabilidad a las condiciones subóptimas. Estos ocurren en diferentes tiempos para los diferentes tejidos. Las células que se dividen rápido tienen mayor riesgo. Los factores que incrementan el riesgo son:</p> <ul style="list-style-type: none"> Demasiado de un químico normal como una hormona, nutriente crítico o vitamina. Deficiencia de un químico normal como una hormona, nutriente crítico o vitamina. Químicos anormales como el alcohol y la nicotina. Fuerzas físicas anormales, como la presión alta. |
| <p>2. La programación tiene efectos permanentes que alteran las respuestas en la vida posterior y pueden modificar la susceptibilidad a la enfermedad.</p> |
| <p>3. El desarrollo fetal es actividad-dependiente de la física fetal. El desarrollo normal es dependiente de una actividad normal continua. Cada fase del desarrollo necesita de ciertas condiciones para el subsecuente desarrollo.</p> |
| <p>4. La programación puede involucrar cambios estructurales en órganos importantes. El número absoluto de células en un órgano puede incrementar o disminuir. Las proporciones relativas y la distribución de diferentes células puede estar desbalanceada. El flujo normal de sangre al órgano puede estar comprometido. Muchos o pocos receptores a hormonas pueden ocasionar un reajuste en la retroalimentación y otros mecanismos de control.</p> |
| <p>5. La placenta juega un papel importante en algunas formas de programación</p> |
| <p>6. La compensación tiene un precio. En un ambiente no favorable, el feto intenta compensar deficiencias. Seguido de esta compensación, el peso al nacer puede ser normal o ligeramente menor. Sin embargo, esta compensación tiene un precio.</p> |
| <p>7. Los intentos para revertir las consecuencias después del nacimiento pueden tener efectos indeseables. Cuando las condiciones posnatales son distintas a las que se preparó el feto, pueden surgir problemas.</p> |
| <p>8. Los mecanismos celulares del feto muchas veces difieren de los procesos del adulto. Los fetos reaccionan diferente a condiciones subóptimas que los recién nacidos o los adultos.</p> |
| <p>9. Los efectos de la programación pueden pasar a través de las generaciones por mecanismos epigenéticos.</p> |
| <p>10. La programación muchas veces tiene efectos diferentes en machos y hembras.</p> |

Tabla 1. Los diez principios de la programación propuestos por Nathanielsz y colaboradores. En estos se especifica cómo puede producirse la programación durante el desarrollo, qué efectos tiene en el feto y su vida posterior. Se puede observar que existen tiempos de vulnerabilidad a las condiciones subóptimas, causando una programación durante el desarrollo en la descendencia. Hay que tener en cuenta que estos efectos pueden pasar a través de varias

generaciones y que pueden tener efectos distintos en los machos y las hembras. Modificado de Nathanielsz et al., 2007 (Nathanielsz et al., 2007).

La programación durante el desarrollo en madres obesas empleando modelos murinos promueve un ambiente lipotóxico, que se asocia con daños en el contenido de ADNmt, alteraciones en la barrera hematoencefálica y disminución del tamaño de la descendencia (McPherson et al., 2015). Además, la obesidad materna causada por la exposición de dietas altas en grasa altera la hemodinámica de útero y placenta incrementando el riesgo de muerte al nacer (Frias et al., 2011). En la descendencia se ha reportado que la dieta materna promueve alteraciones de la homeostasis de tejidos metabólicamente importantes que podrían incrementar el riesgo a resistencia a insulina y DMT2 (Reginato et al., 2016). Además, se ha demostrado en modelos animales que cambios importantes en la dieta materna que incluye la exposición a dieta alta en grasa (HFD), cafetería (CAF, mezcla azúcar-grasa) o alta en azúcar (HSD) durante los periodos susceptibles a programación durante el desarrollo, provocan fallo metabólico, desencadenando resistencia a insulina y DMT2 (Zambrano et al., 2016), enfermedades cardiovasculares e hipertensión, hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis (Wankhade et al., 2016).

2.6 La programación materna por ingesta de dietas hipercalóricas promueve estrés del RE y disfunción mitocondrial

La obesidad materna causada por la ingesta de dieta hipercalórica incrementa los marcadores de estrés del RE como HSPA5, p-PERK y p-IRE en el tejido adiposo e hígado de la descendencia (Z. Wu et al., 2014). Además, empleando un modelo murino se identificó que la obesidad materna induce estrés de RE incrementando los marcadores p-PERK, p-eIF2a, XBP1S, HSPA5 y HSP90 en el hipotálamo (Melo et al., 2014), que puede asociarse con disfunción mitocondrial, como se ha reportado (Nguyen, Saad, Tan, Pollock, & Chen, 2017). Además, la obesidad materna causada por dieta de CAF puede provocar resistencia a la insulina en la descendencia, y desencadenar disfunción y alteraciones en la dinámica mitocondrial mediada por los marcadores de fusión

MFN1 y 2 y OPA y fisión DRP1 en el músculo esquelético (Saben et al., 2016). De interés, estos cambios se preservan hasta por tres generaciones, a través de transmisión por línea germinal (Saben et al., 2016). En el contexto del SNC es importante destacar que la expresión de Drp1 y mitofusinas son de importancia para la regulación del metabolismo de la glucosa (Santoro et al., 2017), además que la obesidad promueve un decremento de MFN2 en el hipotálamo (Diaz et al., 2015) y que la depleción de MFN2 en el hipotálamo causa obesidad, estrés de RE y resistencia a leptina (Schneeberger et al., 2013), puede contemplarse que la lipotoxicidad puede modular la dinámica mitocondrial. En este contexto, se ha propuesto que el control farmacológico del estrés del RE empleando el 4-fenilbutirato, una chaperona química capaz de disminuir la respuesta de estrés de RE, disminuye los marcadores de disfunción mitocondrial en el hipotálamo (Nguyen et al., 2017). Lo anterior sugiere que la homeostasis metabólica durante la programación materna involucra la respuesta del RE a la sobrecarga de nutrientes en el hipotálamo. Sin embargo, es necesario identificar candidatos moleculares ligados a la disfunción de RE-mitocondria y los efectos causados en el metabolismo por la programación materna nutricional en las diferentes etapas de la vida.

3. Justificación

El incremento de obesidad en nuestra población favorece el riesgo de desarrollar alteraciones metabólicas relacionadas con la DMT2. En los últimos años, el aumento en el consumo de alimentos con alto valor calórico representa una de las causas principales en el desarrollo de ganancia energética positiva e incremento de obesidad tanto en adultos como en niños. Sin embargo, a la fecha no está del todo claro si esta exposición a las dietas hipercalóricas puede influir en el metabolismo de las siguientes generaciones.

Se ha propuesto que la obesidad materna o bien la ingesta descontrolada de alimento durante el embarazo, predispone a la descendencia a un mayor riesgo de desarrollar alteraciones metabólicas, un proceso conocido como programación metabólica. Durante la programación metabólica se activa un proceso llamado

lipotoxicidad asociada al incremento y acumulación de ácidos grasos saturados y ceramidas, en órganos blancos que incluyen el SNC. Se sabe que en órganos periféricos tales como, el hígado, páncreas, músculo esquelético y liso, tejido adiposo, la lipotoxicidad induce la activación de estrés de RE, alteraciones en la dinámica y disfunción mitocondrial que correlacionan con alteraciones metabólicas.

Se desconoce a detalle la contribución del efecto lipotóxico a nivel del SNC en la regulación de estas vías de daño y su asociación con las alteraciones metabólicas. Más aún, se ignora también si la programación metabólica de las madres por dietas hipercalóricas selectivas es capaz de promover daño lipotóxico en el SNC que correlacione con cambios en el perfil lipídico en plasma capaz de promover alteraciones metabólicas en la descendencia vinculadas a defectos en la comunicación RE-mitocondria y a la dinámica y disfunción mitocondrial.

De esta manera, en esta tesis se aporta evidencia del efecto de la programación fetal por la ingesta materna de dietas hipercalóricas selectivas en el desarrollo. Cambios selectivos en el perfil lipídico, daño lipotóxico en el SNC y su vínculo con alteraciones en la dinámica mitocondrial en la descendencia asociados al daño metabólico.

4. Preguntas experimentales

A partir de todo lo anterior surgieron las siguientes preguntas: ¿Las dietas hipercalóricas durante el periodo perinatal pueden afectar las interacciones entre el RE-mitocondria, alterando la dinámica mitocondrial de fusión-fisión en el hipotálamo de la descendencia debido a la lipotoxicidad? ¿Las alteraciones se pueden exacerbar con el mantenimiento de la dieta en la descendencia después de la lactancia?

5. Hipótesis

La programación metabólica inducida por la ingesta de dietas hipercalóricas en ratas Wistar madres durante el período perinatal, promueve alteraciones de la función, interacción, estructura y dinámica del RE-mitocondria en el sistema

nervioso de la descendencia, promoviendo complicaciones metabólicas asociadas a obesidad-DMT2.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la programación fetal por exposición a las dietas alta en grasa (HFD), alta en grasa-azúcar (CAF) o alta en azúcar (HSD) durante la gestación, lactancia de ratas y después del destete, sobre la función, interacción, estructura y dinámica del RE-mitocondria en el hipotálamo de la descendencia y su relación con el desarrollo de obesidad-DMT2.

6.2 Objetivos específicos

1. Analizar el efecto en la descendencia masculina de las dietas HFD, CAF o HSD de las madres sobre el desarrollo de obesidad y diabetes.
2. Determinar por medio de lipidómica, el perfil de lípidos de la descendencia masculina de las madres sometidas a las dietas HFD, CAF y HSD.
3. Cuantificar la expresión de marcadores de estrés del RE y función mitocondrial en el hipotálamo, de la descendencia masculina de las madres sometidas a las dietas HFD, CAF y HSD.
4. Identificar alteraciones en la estructura e interacción entre el RE y la mitocondrial en el hipotálamo de la descendencia masculina de las madres sometidas a las dietas HFD, CAF y HSD.

7. Material y métodos

7.1 Anticuerpos

| Anticuerpo | Número de catálogo |
|-------------------------|---------------------------|
| Anticuerpo DRP 1 Rabbit | Cat. 8570, Cell Signaling |
| Anticuerpo MFN2 | Cat. ab56889 Abcam |

| | |
|---|----------------------------|
| Anticuerpo B-actina | Cat. 8457, Cell Signaling |
| Anticuerpo Anti-Rabbit IgG, HRP-linked | Cat. 7074, Cell Signaling |
| Anticuerpo Anti-Mouse IgG, HRP-linked | Cat. 7076S, Cell Signaling |

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la expresión de proteínas de fusión y fisión mitocondrial. Estos fueron diluidos en buffer TBS + Tween 20 al 0.1% con albúmina de suero bovino (BSA, Cat. Sc2323, Santa Cruz Biotechnology, Inc) al 1% si era un anticuerpo primario o al 5% si era secundario.

7.2 Reactivos

| Reactivo | Número de catálogo |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| Tetrametilrodamina (TMRM) | Molecular Probes Cat. T668 |
| ER-Tracker Green | Molecular Probes Cat. E34251 |
| Rhod-2 AM | Molecular Probes Cat. R1245 |
| Pluronic F-127 | Sigma-Aldrich P2443 |
| TRizol | Thermo Fisher Scientific 15596026 |

Tabla 3. Reactivos utilizados durante los experimentos. La TMRM, el ER-Tracker Green, Rhod-2 AM y el Pluronic F-127 fueron utilizados durante los experimentos de función mitocondrial y de RE con estimulación de ácido palmítico. El TRizol fue utilizado durante la extracción del ARNm.

7.3 Línea celular

| Línea celular |
|-------------------------------------|
| mHypoA-CLU 192 de hipotálamo |

Tabla 4. Línea de hipotálamo de ratón utilizada durante los experimentos de función mitocondrial y de RE con estimulación de ácido palmítico.

7.4 Dietas

| Dietas | Contenido calórico |
|----------------|---|
| Control | Densidad calórica de 3.35 Kcal/g dividida en 11% lípidos, 18% proteínas |

| | |
|-----------------------------|--|
| | y 71% carbohidratos |
| Alta en grasa (HFD) | Densidad calórica de 4.9 Kcal/g, dividida en 45% lípidos, 20% proteínas y 35% carbohidratos |
| Cafetería (CAF) | Densidad calórica de 3.72 Kcal/g dividida en 49% de lípidos, 12% de proteínas y 39% de carbohidratos |
| Alta en azúcar (HSD) | Densidad calórica total de 3.39 Kcal/g dividida en 18.5% lípidos, 12.5% proteínas y 69% carbohidratos. |

Tabla 5. Las dietas utilizadas durante la programación nutricional materna y también consumidas por la descendencia masculina. Cada una contiene una densidad calórica y porcentaje de lípidos, proteínas y carbohidratos diferente.

7.5 Animales y manejo

Se emplearon ratas hembras vírgenes de la cepa Wistar de 8 a 10 semanas de edad con un peso de 200-250 gramos y machos vírgenes de 10 a 12 semanas de 300-350 gramos (Fig. 9). Los animales fueron manipulados de acuerdo a la guía del NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio y la NOM-062-ZOO-1999. El protocolo fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina, UANL, con el número de registro BI0002. Las ratas fueron colocadas en cajas de plexiglas individuales a temperatura de 20-23°C, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y comida y agua *ad libitum*.

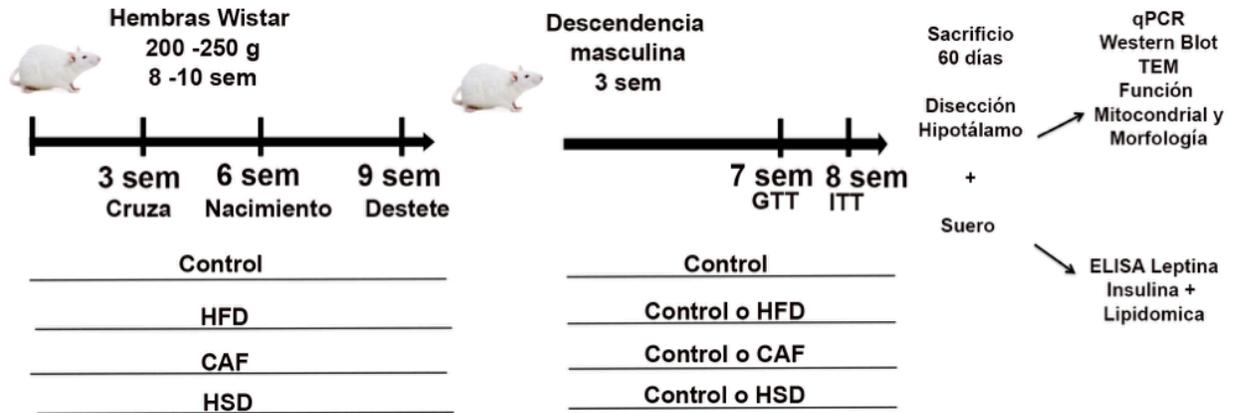


Figura 9. Estrategia experimental del modelo de programación materna. Modelo de metabolismo utilizando a la descendencia de machos. Hembras vírgenes de 8 a 10 semanas fueron alimentadas con las dieta control o con dietas hipercalóricas durante 9 semanas divididas en 3 semanas antes de la gestación, 3 semanas de gestación y 3 de lactancia. Después del destete a los machos se les alimentó con dieta control o dietas hipercalóricas. Durante esta etapa se evaluaron parámetros metabólicos, además de disectarse el hipotálamo y cuantificarse marcadores mitocondriales a nivel de ARNm, proteína y de morfología.

7.6 Modelo Animal de programación materna mediante las dietas HFD, CAF Y HSD

Todos los animales fueron acondicionados al laboratorio siete días previos al inicio de los experimentos. Las hembras se agruparon en cuatro grupos aleatorios de dieta: Grupo control, grupo HFD, grupo CAF y grupo HSD. En estos grupos se alimentaron por nueve semanas, divididas en: tres semanas antes de la cruce, tres semanas de gestación y tres semanas de lactancia. Se registró el peso de las hembras una vez por semana hasta el nacimiento de las crías. A la tercera semana de dieta, las hembras se cruzaron con machos alimentados con dieta control de 13 a 15 semanas de edad y peso aproximado de 300 - 350 g. La copula se registró identificando el tapón vaginal 24 h posterior a la monta.

Inmediatamente después del nacimiento, se registró el peso de la camada completa. En la mayoría de los experimentos, registramos camadas de 15 crías. A los 21 días de edad se realizó el destete, se descartó a las hembras y se agruparon los machos en 7 nuevos grupos en donde se les alimentó con dieta control o se les mantuvo la misma dieta que consumió su madre hasta alcanzar

los 60 días de edad. Con ello, se obtuvieron un total de 7 grupos experimentales: Control, HFD-C, CAF-C, HSD-C y HFD-HFD, CAF-CAF y HSD-HSD. A todos los machos se les cuantificó el consumo de alimento y el peso semanal durante la edad de 21 a 49 días (Fig. 9).

7.7 Pruebas de tolerancia a la glucosa y a la insulina (GTT e ITT)

Al alcanzar los 49 días de edad, cada uno de los animales se sometió a las pruebas de GTT e ITT al día 50 y 57 de edad, respectivamente. Las crías macho se dejaron en ayunas durante 8 a 12 horas y se cuantificó (empleando un glucómetro, Accu-Check, Cat. 05987270, Roche) la glucosa basal (0 min) a partir de una gota de sangre de la vena caudal. Posteriormente, se les inyectó vía intraperitoneal 40% de glucosa/kg peso o 1U de insulina/100g de peso del animal. Los niveles de glucosa fueron cuantificados a los 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min y 120 min posteriores a la administración (Prieur et al., 2011). La glucosa en sangre fue calculada con "MediSense optium" para registrar el resultado en mg/dL.

7.8 Disección y homogenizado del tejido cerebral y recolección de suero

Los machos se sacrificaron por decapitación al día 60 de edad. Se colectaron muestras de sangre en tubos amarillos de 500 microlitros (Beckton Dickinson) y se aisló la fracción del suero por centrifugación a 5000 rpm x 10 min a 4°C. Esta fracción fue congelada y almacenada a -80°C hasta su posterior uso. Por su parte, los hipotálamos fueron disectados y divididos en dos hemisferios, el izquierdo para el análisis de ARNm y expresión de genes y el derecho para la expresión de proteínas. Además, se recolectó y se pesó el hígado y el tejido adiposo blanco retroperitoneal, antes de su almacenamiento a -80°C.

7.9 Determinación en suero de las concentraciones de insulina y leptina

La insulina y leptina en suero fue determinada por medio de pruebas de ELISA a través de los kits de Millipore (Millipore, Cat. EZRMI-13K insulina y Cat. EZML-82K leptina) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.10 Determinación del perfil lipidómico en suero por medio de Cromatografía en fase Líquida-Espectrometría de masas

Los extractos se inyectaron en un sistema HPLC que contiene una columna de gel de silica de fase reversa previamente condicionada con 3 ml de MeOH + 3 ml de CHCl₃. Una vez que ingresó la muestra en la fase sólida, las columnas se lavaron con 3 ml de CHCl₃ y los esfingolípidos y fosfolípidos se recuperaron de la columna en tubos de vidrio empleando 3 ml de MeOH. Las muestras se secaron empleando una corriente de N₂ a 40°C.

La identificación de las especies de lípidos provenientes de las muestras de suero se realizó empleando un espectrómetro de masas modelo “PE Sciex API 3000 triple quadrupole” acoplado a electrospray (200°C) para inducir la ionización de los lípidos y el software “Analyst 1.1 data system” para su análisis. El principio tecnológico de este sistema se basa en que la estructura molecular de los lípidos se ioniza induciendo la carga de las moléculas y con ello el espectrómetro puede distinguir e identificar a las especies por masa y carga (m/z).

Para la identificación de esfingolípidos, las muestras secadas se resuspendieron en 100 µl de MeOH y se colocaron por duplicado en micropozos. Se inyectaron 10 µl de muestra en el espectrómetro de masas conteniendo MeOH como la fase principal a flujo de 80 µl/min. Se usó N₂ como fuente de colisión a una presión de 2×10^{-5} Torr.

La cuantificación de lípidos se llevó a cabo empleando el método reportado por Hein et al. 2008 (Hein, Duplock, Hopwood, & Fuller, 2008) y el método de Smyth et al. 2008 (Smyth et al., 2008). Las concentraciones de cada especie de lípido se calcularon con base en la altura del pico de cada estándar en donde la trihexosilceramida (THC) y las especies de esfingomielina se compararon con DHC 16:0(d3) y PC 14:0/14:0, respectivamente.

7.11 Aislamiento de ARN y RT-PCR

La extracción de ARN de las muestras de hipotálamo se realizó siguiendo un protocolo descrito anteriormente (Camacho et al., 2012). La RT-PCR fue realizada empleando el kit de High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied

biosystems, Cat. 4368814) y usando Random primers como iniciadores. Se emplearon 2000 ng de la muestra de ARN en un total de 20 μ L de reacción.

7.12 PCR cuantitativa (qPCR)

Se realizó la qPCR usando 10 ng de cDNA, el master mix de Light Cycler SBYR green 480 (Roche, Cat. 04707516001) utilizando un volumen total de reacción de 10 μ L y los siguientes primers: Mfn2 Forward (5'- CCATGTGTCGCTTATCCTTCT-3'), Reverse (5'-TGA CTCCAGCCATGTCCAT-3'); Itpr Forward (5'-CACCTATGACCACACTGTCTC-3'), Reverse (5'-AAGAACFCCATGAGAGTGAC-3'); Hspa5 Forward (5'-CCAGTCAGATCAAATGTACCCA-3'), Reverse (5'ATCAGCCCACCGTAACAATC- 3'); Tfam Forward (5'-GTACACCTTCCACTCAGCTTT-3') Reverse (5'AGCTAAACACCCAGATGCAA-3'); Drp1 Forward (5'-AACCTTCCCATCAATACATCC-3') Reverse (5'-TCCAGAGAGGTAGATCCAGATG-3'); Opa1 Forward (5'-TGTTCTGAGTTCATGGTCTG-3') Reverse (5'-CTGAGCCAGGTTACTCCAAAG-3') (Integrated DNA Technologies). Se utilizó el gen normalizador GADPH Forward (5'-GTAACCAGGCGTCCGATAC-3') Reverse (5'- TCTCTGCTCCTCCCTGTTC-3') (Integrated DNA Technologies).

7.13 Análisis de proteínas por medio de Western Blot

Los hipotálamos del hemisferio derecho previamente congelados se homogenizaron en 500 μ L de buffer de lisis. Posteriormente, se empleó el método de Bradford para cuantificar los niveles de proteína por μ L. Se corrieron geles de SDS-PAGE cargando 35 μ g de proteína por carril. Las muestras se mezclaron con Laemmli buffer y se calentaron a 95°C por 5 min y se corrieron en amortiguador de glicina a voltaje de 110 mV. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa.

Las membranas se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente en amortiguador TBS-T (10mM Tris, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) que contenía 5% de BSA. Las membranas se incubaron toda la noche con anticuerpos

primarios a 4°C: anti-MFN2 (1:1000), anti-DRP1 (1:2000), B-actina (1:3000) y posteriormente, se incubaron con anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano como anticuerpo secundario (1:3000). Las proteínas fueron detectadas por el equipo Chemidoc XRS de BioRad. Las imágenes fueron cuantificadas por densitometría con el software ImageJ 1.50i (Wayne, Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

7.14 Microscopia de transmisión electrónica

Las muestras de hipocampo del grupo de CAF-CAF (n =4) y Control (n =4) se fijaron en 2.5% de glutaraldehído en 0.1M de cacodilato de sodio (pH 7.4) por 2 horas a temperatura ambiente, después se post-fijo con 1% OsO₄ en 0.1M de cacodilato de sodio y contrateñido en 1% de nitrato uranil. Las muestras de tejido fueron deshidratadas con un gradiente de acetona seriado y se embebieron en resina Epon 812 para seccionarlas. Las imágenes ultraestructurales de las secciones delgadas fueron observadas bajo un microscopio de transmisión electrónica Carl-Zeiss EM 109.

7.16 Análisis de la masa mitocondrial, potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) y actividad del RE empleando un sistema *in vitro*

Para determinar la dinámica del RE-mitocondrial, se empleó un sistema *in vitro*. Se cultivaron las células de la línea mHypoA-CLU 192 en cubreobjetos de 22 mm en medio de cultivo DMEM 1X con 10% de suero fetal bovino (SFB) 25mM de glucosa y 1% de penicilina/estreptomicina y mantenidas a 37°C con 5% de CO₂ por 24 horas. Las células fueron pre-tratadas con PAL 50 μ M a diferentes tiempos que consistieron de 1h, 3h, 6h y 12 h.

Posteriormente, las células se cargaron por 30 min a temperatura ambiente con el medio de registro (MR) que contenía los fluoróforos TMRM para el potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) y ER-Tracker a 25nM y 1 μ M. Después de 30 minutos, las células fueron lavadas con solución salina que contenía 25 nM de TMRM. Las imágenes fueron obtenidas usando el microscopio confocal Zeiss Axiovert 100M

con lentes de inmersión de aceite Plan-Neofluar x63/1.25 y equipado con un láser helio-neón a temperatura ambiente. Cabe destacar que la onda de excitación para que TMRM genere fluorescencia mediante el láser es de 543 nm y para ER-Tracker Green es de 488 nm.

Para el plano de z-stack, los dos canales de ER-Tracker Green y TMRM fueron separados, seguido de la sustracción de la fluorescencia de fondo, para tener dos imágenes binarias separadas. La proporción de citoplasma (marcada con ER-Tracker Green) ocupada por la red mitocondrial (marcada con TMRM) fue calculada del área de las dos imágenes, calculando la fracción del volumen mitocondrial que ocupaba del citosol. Las imágenes fueron analizadas usando el software ImageJ .50i (Wayne, Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

7.17 Concentración de Ca^{2+} mitocondrial

Para determinar los cambios en la concentración de calcio en la mitocondria, las células se cultivaron en cubreobjetos de 22 mm y pre-tratadas con PAL por 3 horas y se cargaron por 30 min a temperatura ambiente con MR que contenía 20 μM de Rhod-2 AM y 0.02% Pluronic F-127. La intensidad de fluorescencia fue registrada cada 15 s. Las imágenes fueron obtenidas usando el microscopio confocal Zeiss Axiovert 100M con lentes de inmersión de aceite Plan-Neofluar x63/1.25 y equipado con un láser helio-neón a temperatura ambiente. Las imágenes marcadas con fluorescencia con Rhod-2 AM fueron colectadas usando la onda de excitación de 514 nm. La fluorescencia de Rhod-2 AM fue normalizada y graficada usando el software ImageJ 50i (Wayne, Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

7.18 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado usando el software GraphPad Prism 7 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA). Inicialmente, se realizaron pruebas de normalidad a los datos mediante la prueba de normalidad de Shapiro Wilk. Los datos fueron expresados en media \pm SD. Los datos presentados fueron analizados

usando análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías), análisis de varianza (ANOVA) o la prueba t student. Se realizó la prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Dunnett. Los datos fueron considerados significativos con una *p < 0.05, **p< 0.01, *** p < 0.001, ****p <0.0001.

8. Resultados

8.1.1 La dieta de CAF altera el peso de las madres durante la gestación

Después de separar a las hembras en 4 grupos de dietas, Control, HFD, CAF y HSD, se determinó el peso semanal de las hembras durante 7 semanas que incluían las semanas antes, durante la crusa y la gestación. Se encontró que comparado con las dietas HFD y HSD, la exposición a dieta de CAF durante la gestación disminuyó su peso significativamente (Fig. 10).

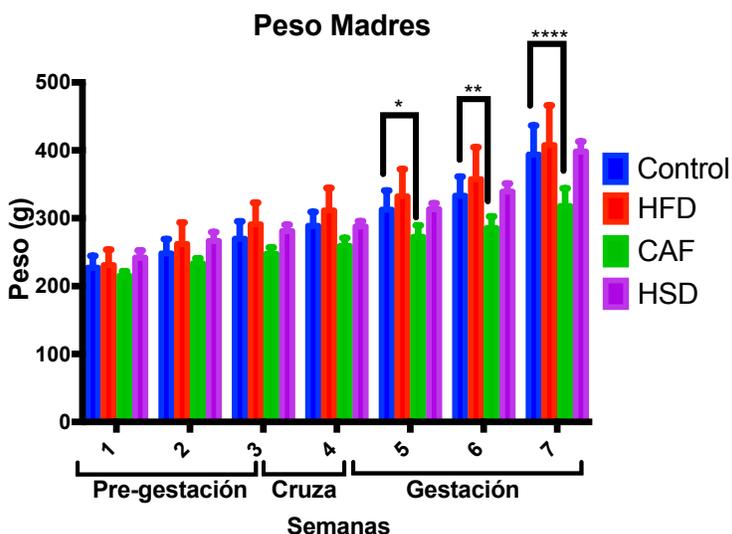


Figura 10. Peso de las hembras desde la etapa de pre-gestación hasta días antes del nacimiento de las crías. Como se puede observar el grupo de CAF disminuyó su peso significativamente a partir de la semana 5 empezado el experimento, justo la primera semana de gestación. En las barras se observan los promedios \pm SD. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (*p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001).

8.1.2 Las dietas CAF y HSD alteran el peso promedio de la descendencia al nacer.

En esta etapa se cuantificó el peso de las crías al momento del nacimiento. Se identificó que la exposición a dieta de HSD incrementa, mientras que la dieta HFD disminuye el peso de las crías al nacer (Fig. 11).

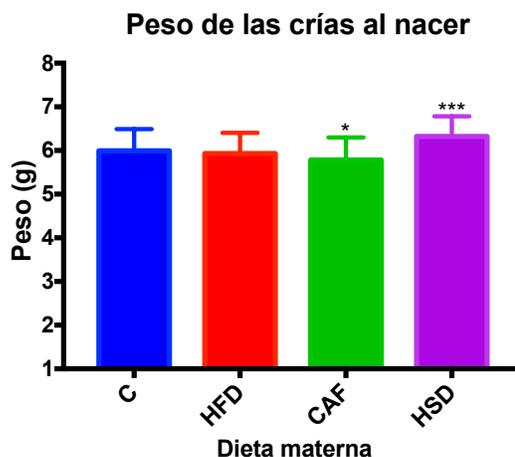


Figura 11. Peso de las crías al momento del nacimiento. Se pesó a cada cría recién nacida y se encontró que la dieta de CAF promueve un peso menor al nacer y la dieta HSD un peso mayor al nacer cuando se comparó estos grupos con el control. En las barras se observan los promedios \pm SD. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

8.1.3 La programación materna con dietas HFD y CAF y el consumo de dieta de CAF después del destete alteran el peso corporal

Posterior al destete de la descendencia masculina, se les alimentó con dieta control o con la dieta hipercalórica que había consumido su madre y se registró su peso de la tercera a la séptima semana de vida. Los resultados indican que durante la semana 4 y 5 de edad después del destete, los descendientes de las madres alimentadas con CAF y después alimentados con dieta control (CAF-C) presentan un menor peso comparados con el control (Fig. 12A). Por otro lado, el grupo de los descendientes de las madres alimentadas con HFD y su posterior exposición a dieta control después del destete (HFD-C), aumentaron significativamente su peso durante la semana 6 y 7 de edad (Fig. 12A).

Por su parte, la exposición a dietas hipercalóricas después del destete presentes en los grupos CAF-CAF, HSD-HSD y HFD-HFD muestran que los

descendientes exhiben un menor peso entre la semana 4 - 6 en comparación al control, y que inclusive estas alteraciones pueden aún mantenerse hasta la semana 7 para el grupo CAF-CAF (Fig. 12B).

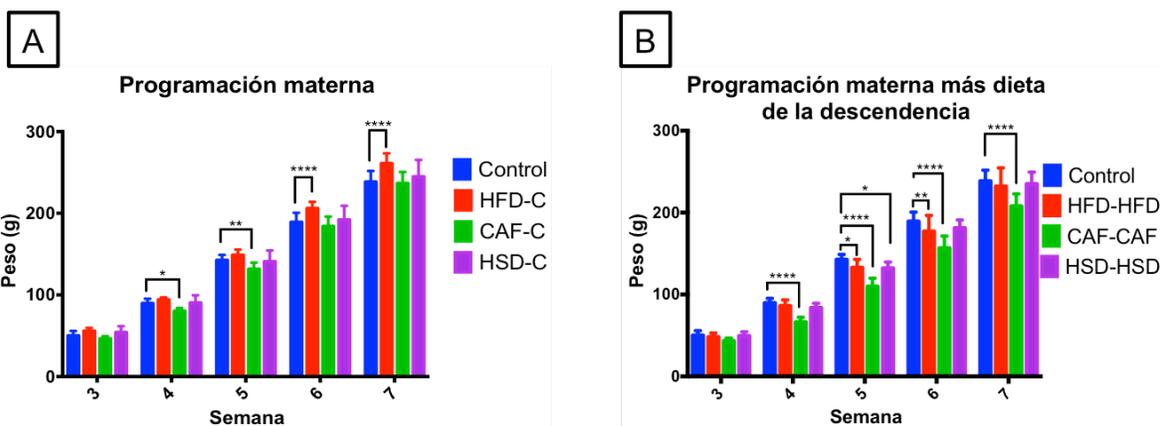


Figura 12. Efecto de la programación materna en el peso de la descendencia masculina después del destete al día 21 de edad hasta la séptima semana de vida. A) Peso después de la programación materna. Se puede observar que la programación materna propicia un decremento en el peso del grupo CAF-C durante la cuarta y quinta semana de vida y en el grupo HFD-C causa un aumento del peso entre la sexta y séptima semana. B) Peso después de la programación materna más dieta después de la dieta de la descendencia después del destete. Además, si las crías después de la programación son alimentadas con la misma dieta de su madre, también hay alteración del peso, disminuyendo para los grupos CAF-CAF, HFD-HFD y HSD-HSD entre la cuarta a la séptima semana, la quinta y sexta semana y la quinta semana respectivamente. En las barras se observan los promedios \pm SD. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

8.1.4 La exposición a dieta HFD durante la programación materna y posterior al destete disminuye el consumo de alimento y la eficiencia alimentaria

Se cuantificó la cantidad de alimento y número de calorías consumidas en los grupos experimentales durante 27 días (incluidos día 22 - 49 de edad). Los resultados indican que no existen diferencias para los grupos de programación que recibieron la dieta control después del destete (Fig. 13 A, B, C, D). Sin embargo, para los sujetos que recibieron nuevamente la dieta de HFD (grupo HFD-HFD), muestran un menor consumo lo que significó una menor cantidad de calorías (Fig. 13 B,D). Además, la ingesta de dieta HFD disminuye la eficiencia de alimento (Fig. 13F).

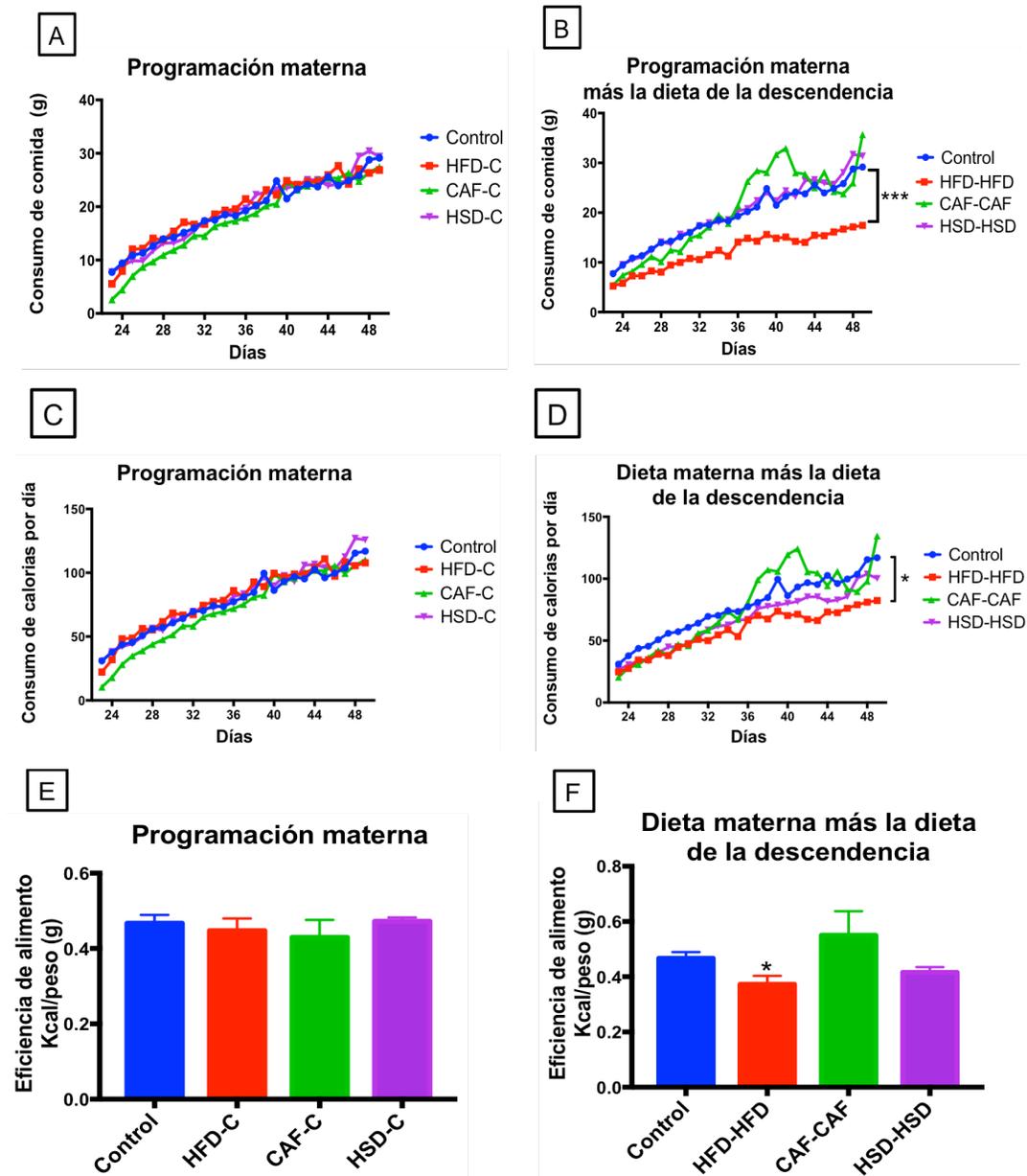
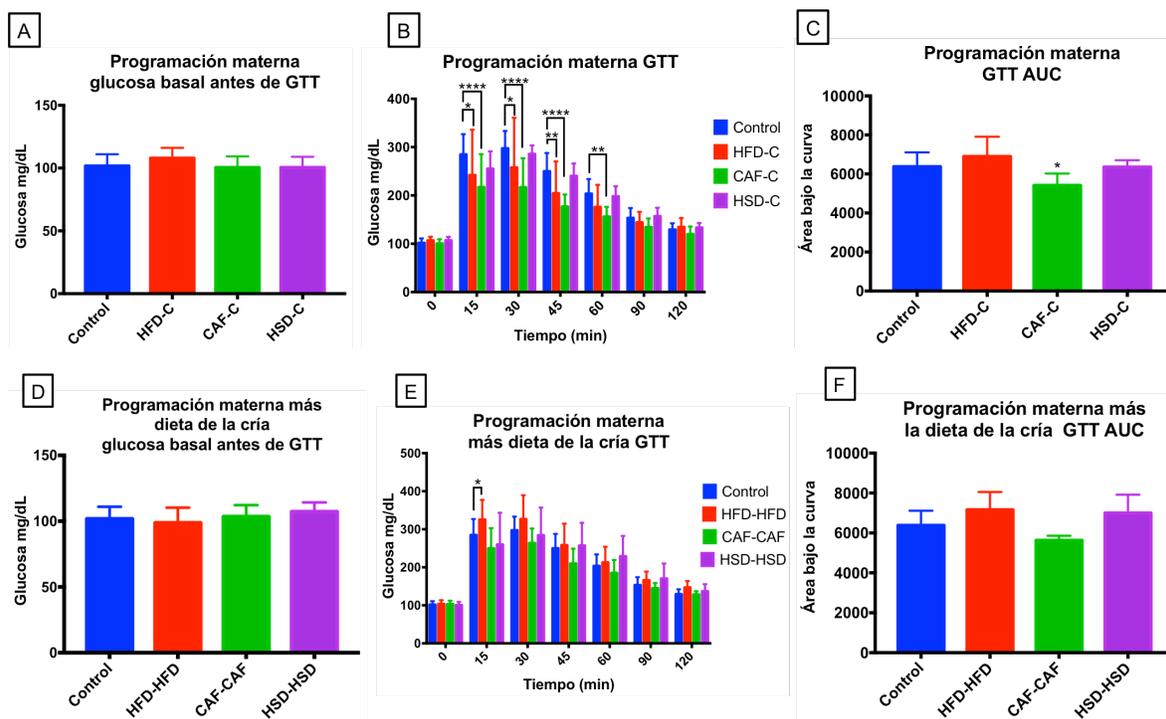


Figura 13. Efecto de la programación materna en el consumo de alimento, calorías y eficiencia de alimento de los grupos de programación materna y de dietas después del destete. A, C, E) Consumo de alimento, calorías y eficiencia de alimento después de la programación materna B, D, F) Consumo de alimento, calorías y eficiencia de alimento después programación materna más la dieta de la descendencia después del destete. Se observa que el grupo HFD-HFD consumió menos alimento y calorías significativamente, además tuvo una eficiencia de alimentos menor. Se muestran los promedios \pm SD. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

8.1.5 La exposición a las dietas CAF y HFD durante el embarazo y lactancia altera la sensibilidad a la glucosa e insulina

En los siguientes experimentos analizamos el efecto de las dietas hipercalóricas sobre la sensibilidad a la glucosa e insulina. La descendencia masculina fue analizada entre los días 50 -57 mediante las pruebas de GTT e ITT respectivamente. Se encontró que no hubo diferencias significativas en la concentración de glucosa basal en ninguno de los grupos durante la prueba de GTT (Fig. 14 A y D). Además, los resultados muestran que no existen cambios en la sensibilidad a la glucosa después de la programación materna en los grupos HFD-C y HSD-C. Interesantemente, el grupo CAF-C mostró decremento de la sensibilidad a la glucosa en la curva de tolerancia (Fig. 14 B y C). Por su parte, la exposición a dieta calórica después del destete de la descendencia tampoco induce alteraciones en la glucosa basal antes de la prueba de GTT ni diferencias significativas en el área bajo la curva (Fig. 14 D, E y F).



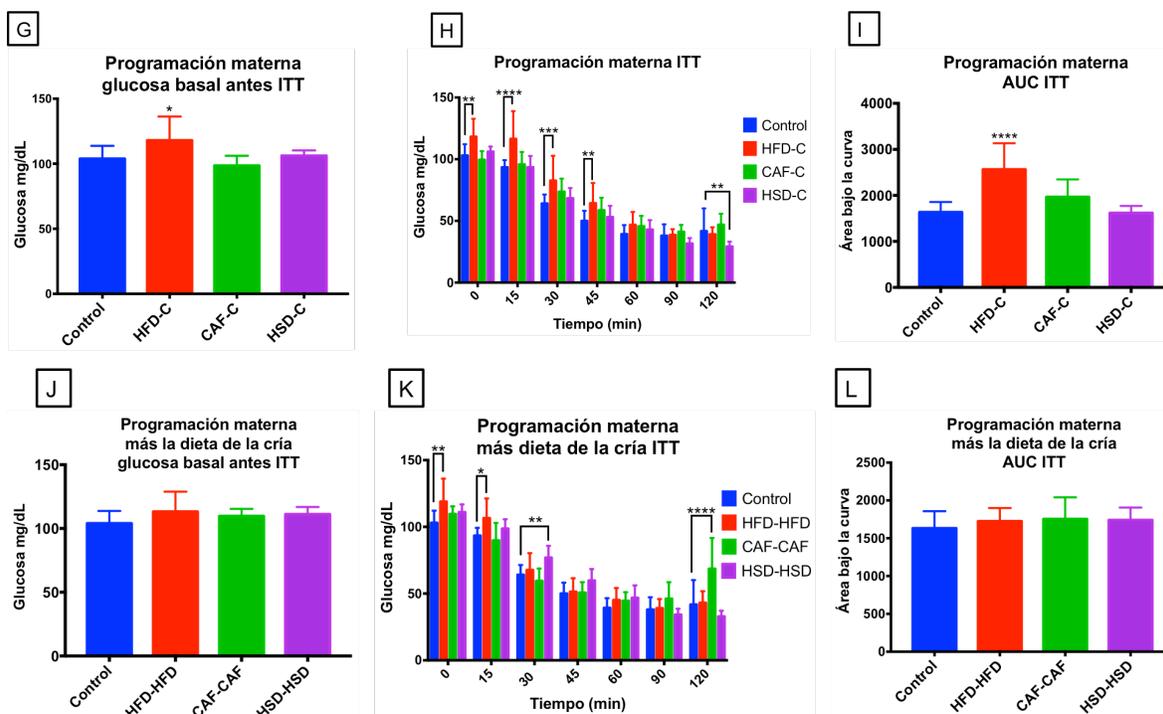


Figura 14. Efecto de la programación materna en la homeostasis de glucosa de la descendencia masculina. A, D, G y J) Concentración de glucosa basal antes de las pruebas de GTT e ITT. B, E, H y K) La concentración de glucosa fue medida a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min. C y F) Área bajo la curva para todos los grupos durante la prueba de GTT. I y L) Área bajo la curva para todos los grupos durante la prueba de ITT. Se muestran los promedios \pm SD. Se realizaron pruebas de ANOVA de una vía o de dos vías de medidas repetidas según el caso, además de una prueba post hoc de Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.001$).**

Al evaluar la sensibilidad a la insulina se evidenció que el grupo de programación materna HFD-C mostró incremento de la glucosa basal comparado con el grupo control (Fig. 14 G, H e I). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de glucosa basal y en el área bajo la curva de ITT en los grupos expuestos a dieta calórica después del destete.

8.1.6 La exposición a dieta HFD y CAF durante la programación materna y posterior al destete aumenta las concentraciones de insulina y leptina en la descendencia

Se cuantificaron los niveles de insulina y leptina en suero asociados con la exposición de dietas hipercalóricas durante la programación materna y después del destete. Se encontró que la programación por HFD, CAF y HSD incrementa la

concentración de insulina y leptina en el suero (Tabla 6). Además, en los grupos que consumieron las dietas HFD y CAF después del destete incrementaron su concentración de insulina y leptina con respecto al control (Tabla 6).

| Insulina | | | | |
|--|---------|---------------------|-------|------------|
| Experimento | Grupo | Concentración ng/μL | DEM | Valor de P |
| Programación materna | Control | 0.078 | 0.003 | N/A |
| | HFD-C | 0.163 | 0.055 | 0.0009*** |
| | CAF-C | 1.234 | 0.497 | 0.6189 |
| | HSD-C | 0.074 | 0.014 | 0.9617 |
| Programación materna + dieta descendencia | Control | 0.078 | 0.003 | N/A |
| | HFD-HFD | 0.248 | 0.081 | 0.0001**** |
| | CAF-CAF | 0.264 | 0.054 | 0.0001**** |
| | HSD-HSD | 0.089 | 0.007 | 0.951 |

| Leptina | | | | |
|--|---------|---------------------|-------|------------|
| Experimento | Grupo | Concentración ng/μL | DEM | Valor de P |
| Programación materna | Control | 0.067 | 0.019 | N/A |
| | HFD-C | 0.063 | 0.009 | 0.7709 |
| | CAF-C | 17.026 | 3.983 | 0.0001**** |
| | HSD-C | 0.053 | 0.003 | 0.0355* |
| Programación materna + dieta descendencia | Control | 0.067 | 0.019 | N/A |
| | HFD-HFD | 0.104 | 0.019 | 0.0007*** |
| | CAF-CAF | 0.098 | 0.020 | 0.0002*** |
| | HSD-HSD | 0.059 | 0.005 | 0.5173 |

Tabla 6. Concentraciones de insulina y leptina de la descendencia masculina. Se determinó las concentraciones de insulina y leptina a partir de muestras de suero tomadas durante el sacrificio el día 60 de edad y determinadas a través de pruebas de ELISA. Se muestran los promedios \pm SD. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

8.1.7 La exposición a dietas hipercalóricas durante la programación materna y posterior al destete alteran el peso del hígado y tejido adiposo en la descendencia

Después del sacrificio al día 60, se cuantificó el peso del hígado y el tejido adiposo retroperitoneal de los modelos animales. Se encontró que la exposición de dietas hipercalóricas durante la programación materna por HFD, CAF o HSD no afectó el peso del hígado de la descendencia (Fig. 15 A), sin embargo, si la exposición HFD y CAF se continua aún después del destete se promueve decremento significativo en el peso del hígado (Fig. 15 B). Además, se observó un que el incremento en el peso del tejido adiposo asociado a la programación materna por HFD (Fig. 15 C). Por último, la exposición a dietas hipercalóricas

después de la programación causó un aumento en el tejido adiposo de los grupos HFD-HFD, CAF-CAF y HSD-HSD en comparación al grupo control (Fig. 15 D).

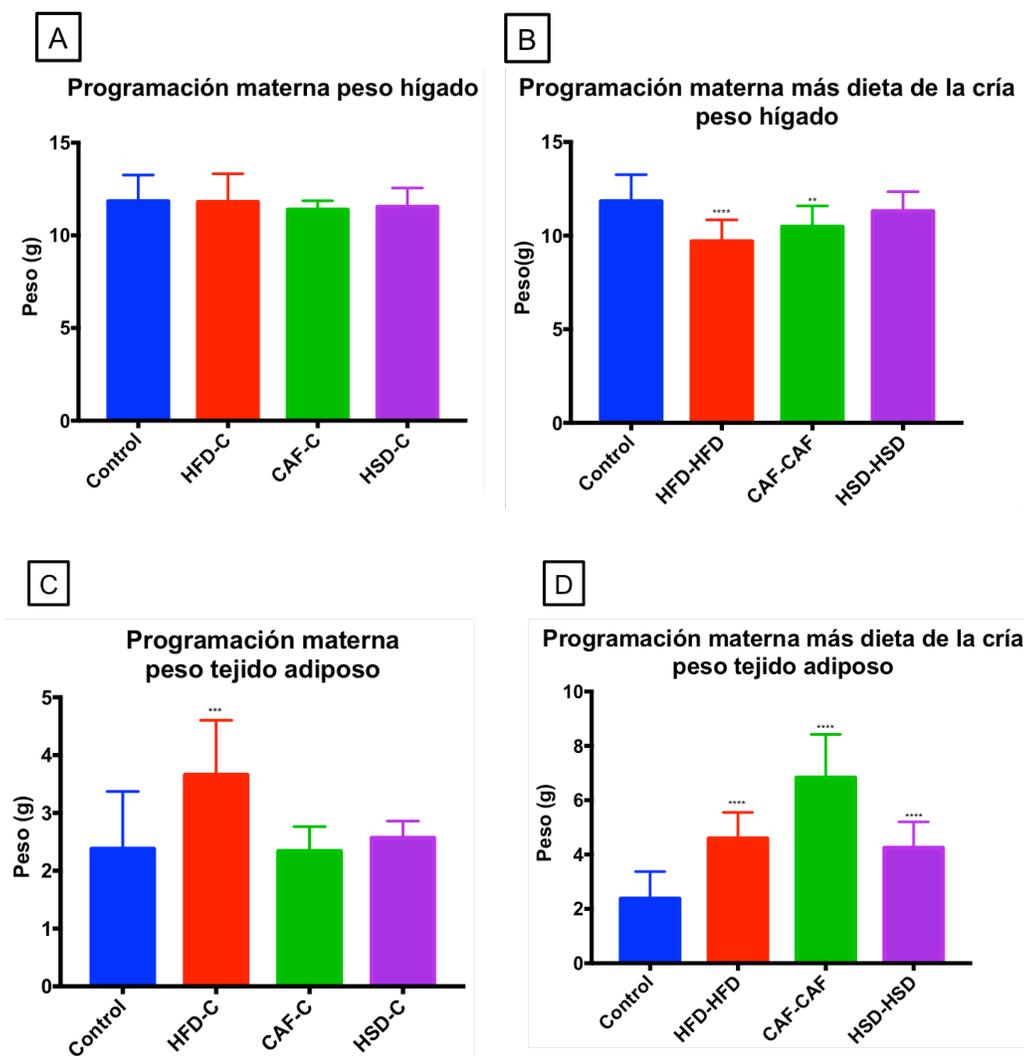


Figura 15. Efecto de la programación materna por las dietas en el peso del hígado y tejido adiposo de la descendencia. A y B) Peso del hígado, C,D) peso del tejido adiposo de todos los grupos. Se muestran los promedios \pm SD. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

8.2 La exposición a las dietas HFD, CAF y HSD durante la programación materna y posterior al destete alteran el perfil lipidómico en el suero de la descendencia

La determinación del perfil lipidómico en suero se analizó con nuestra colaboradora la Dra. María Fuller de la Universidad de Adelaide, Australia. Se

cuantificaron las concentraciones de diacilglicéridos, triglicéridos y de diferentes especies de esfingolípidos como lo son las ceramidas, dihexosilceramidas, dihidroceramidas, monohexosilceramidas, esfinganina y esfingosina. Estos lípidos han sido involucrados en procesos de lipotoxicidad y daño metabólico por lo que su identificación es de relevancia para el presente proyecto.

8.2.1 Diacilglicéridos

El perfil de concentración de diacilglicéridos totales en sangre incrementa significativamente en los grupos HFD-HFD y CAF-CAF, mientras que en el grupo HSD-C se observó un decremento significativo en sus concentraciones (Fig. 16 A). La identificación de las especies individuales arrojó que el grupo HFD-HFD promueve el incremento significativo de DG(18:1/18:1), DG(18:1/18:2), DG(18:1/20:4) y DG(18:2/18:2) (Fig. 16 A y B). Por su parte, para el grupo CAF-CAF se observa un aumento significativo de las especies DG(16:0/18:2), DG(16:0/20:4), DG(18:1/18:1), DG(18:1/16:0), DG(18:2/18:2) y DG(18:1/20:4), (Fig. 16 A y B). En contraste, la programación por dieta CAF y HSD disminuyó la concentración de DG(18:1/18:1) y de DG(18:1/18:1) y DG(18:2/18:2) para el grupo programado con HSD (Fig. 16 A y B). También hay que destacar que el grupo HSD-HSD exhibió incremento en las concentraciones de DG(18:1/18:1) y disminución de DG(18:2/18:2) (Fig. 16 A y B).

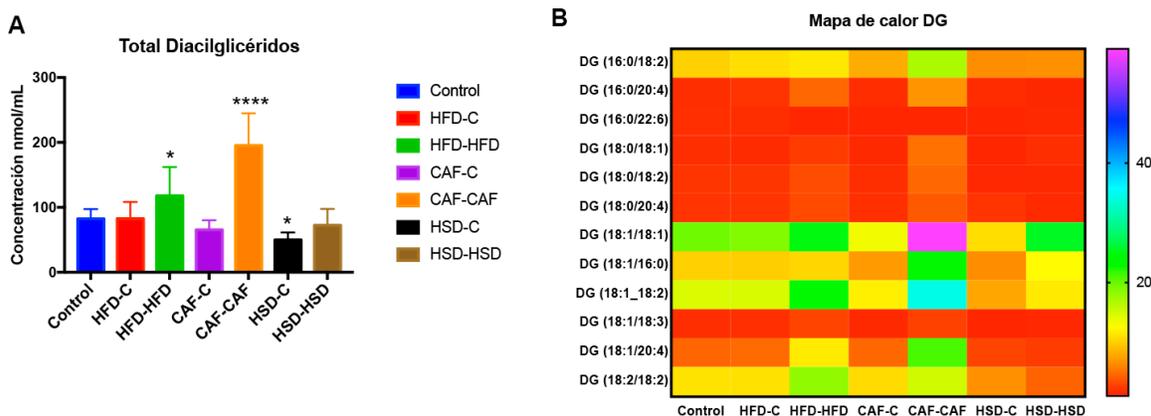


Figura 16. Concentraciones de diacilglicéridos. A) Total de diacilglicéridos. Se muestran los promedios de las concentraciones totales de Diacilglicéridos \pm SD. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (* p <0.05, ** p <0.01 y *** p <0.001). **B)**

Mapa de calor de las concentraciones de diacilglicéridos. Se muestran los promedios. Se realizó una prueba de ANOVA de dos vías más una prueba post hoc de Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

8.2.2 Triglicéridos

De manera general, las concentraciones de triglicéridos totales en sangre se encontraron significativamente elevadas en el grupo CAF-CAF (Fig. 17 A). De este grupo, se analizaron 57 especies de triglicéridos diferentes, demostrando que la exposición a dieta CAF durante la programación fetal y posterior al destete presenta los mayores efectos del perfil lipídico (Fig. 17 B, C, D, E y F). De manera particular, el mapa de calor muestra que la dieta CAF induce un aumento de las especies de TG(16:0/32:0), TG(16:0/36:2)+1, TG(16:0/36:4), TG(18:0/34:1), TG(18:0/36:2), TG(18:1/32:0)+1, TG(18:1/36:2)+1, TG(18:2/32:0), TG(18:2/34:1)+1, TG(18:2/36:2) y una disminución en las concentraciones de TG(20:4/36:2), y TG(22:6/36:3). Las especies de triglicéridos que más aumentan significativamente en el grupo de exposición a dieta HFD corresponden a TG(16:0/36:4), TG(18:0/36:2), TG(18:1/36:2)+1, TG(18:2/34:1)+1, TG(18:2/36:2), TG(20:4/36:2) y TG(20:4/36:3), y los que disminuyeron fueron TG(16:1/34:2)+1 y TG(22:6/36:3) (Fig. 17 B, C, D, E y F). Por su parte, en el grupo HSD-HSD se observa un incremento en las concentraciones TG(16:0/32:0), TG(16:0/36:2)+1 (Fig. 17B), TG(18:1/32:1)+1, TG(18:2/34:1)+1 (Fig. 16 D y E) y una disminución en las especies TG(16:0/36:4), TG(18:1/36:2)+1 (Figura 16 B y D). De interés, para la programación por dieta inducida por exposición a CAF se observó decremento en las concentraciones de TG(16:0/36:2)+1, TG (16:1/34:2) +1 (Fig. 17 C) y TG (18:1/32:1) +1 (Fig. 17D), mientras que para la programación con HSD se observó una disminución de la concentración de TG (16:0/36:2) +1 (Fig. 17 B) y aumento en TG(16:0/36:4) y TG (18:2/34:1) +1 (Fig. 16 B y E). No se observaron cambios en la programación fetal con HFD.

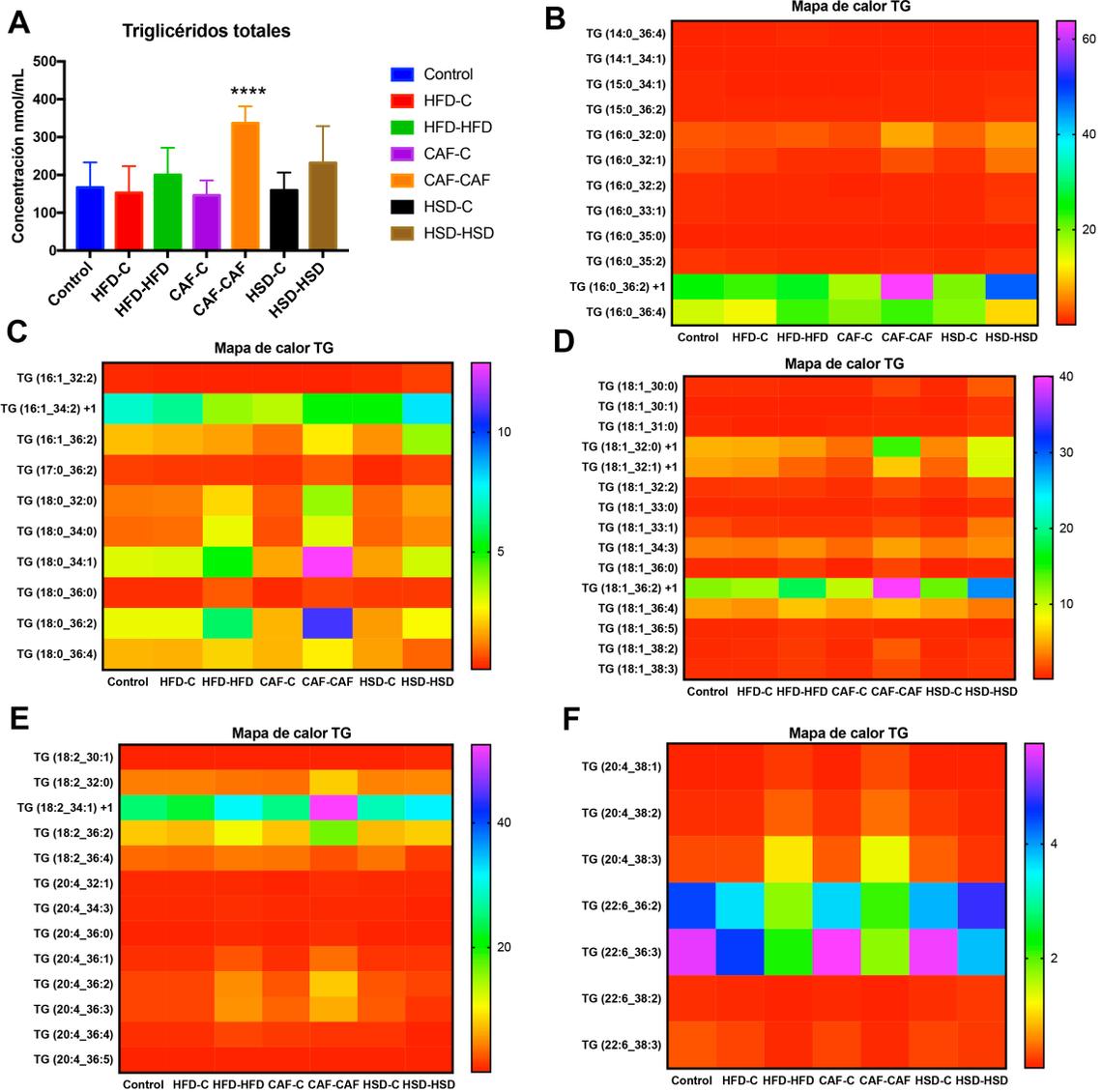


Figura 17. Concentración de triglicéridos. A) Total de Triglicéridos. Se muestran los promedios \pm SD. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$). B) Mapa de calor de los TG de 14:0 a 16:0 en una de sus cadenas de ácidos grasos C) Mapa de calor de TG de 16:1 a 18:0 en una de sus cadenas de ácidos grasos. D) Mapa de calor de TG 18:1 en una de sus cadenas de ácidos grasos. E) Mapa de calor de TG de 18:2 A 20:4 en una de sus cadenas de ácidos grasos. F) Mapa de calor de TG de 20:4 a 22:4 en una de sus cadenas de ácidos grasos. En estos mapas de calor se realizó una prueba de ANOVA de dos vías más una prueba post hoc de Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

8.2.3 Esfingolípidos

8.2.3.1 Ceramidas

Para el grupo de las ceramidas, identificamos que la exposición a dieta CAF durante la programación fetal y posterior al destete promueve incremento en las concentraciones totales de ceramidas y disminución cuando se programa con la dieta HSD (Fig. 18 A). En particular, las especies de ceramidas que incrementan son Cer 22:0, Cer 24:0 y Cer 25:0 (Fig. 18 B). La Cer 24:0 aumentó significativamente en los grupos HFD-HFD y CAF-C y disminuyó significativamente en los grupos HFD-C, HSD-C y HSD-HSD (Fig. 18B).

8.2.3.2 Dihexosilceramidas (DHC)

No se encontraron diferencias significativas en el total de DHC entre los grupos analizados (Fig. 18 C), sin embargo, se observa un incremento positivo de la especie DHC 16:0 inducida por el grupo CAF-C (Fig. 18 D).

8.2.3.3 Dihidroceramidas (dHCer)

La exposición a dieta CAF durante la programación fetal y posterior al destete también promueve incremento en la concentración de dHCer totales (Figura 18 E). De manera específica, se observa incremento de las especies dHCer 18:0, 24:0 (Fig. 18 F), en donde la especie dHCer también se observa acumulada en los grupos HFD-HFD y HSD-C (Fig. 18 F).

8.2.3.4 Monohexosilceramidas (MHC)

La concentración de MHC total disminuyó significativamente en los grupos CAF-C y HSD-C (Fig. 18 G). La concentración de MHC 22:0 disminuyó en los grupos CAF-C, HSD-C y HSD-HSD, MHC 23:0 disminuyó significativamente en HFD-HFD, MHC 24:0 aumentó su concentración en los grupos HFD-HFD, CAF-C, HSD-C y HSD-HSD y por último MHC 24:1 disminuyó su concentración en CAF-C y HSD-C (Fig. 18 H).

8.2.3.5 Esfingosinas

De manera interesante, la programación fetal por exposición de HSD o bien su ingesta después del destete induce incremento significativo en la concentración en sangre de las especies esfinganina (d18:0) y esfingosina (d18:1) comparadas con el grupo control (Fig. 18 I).

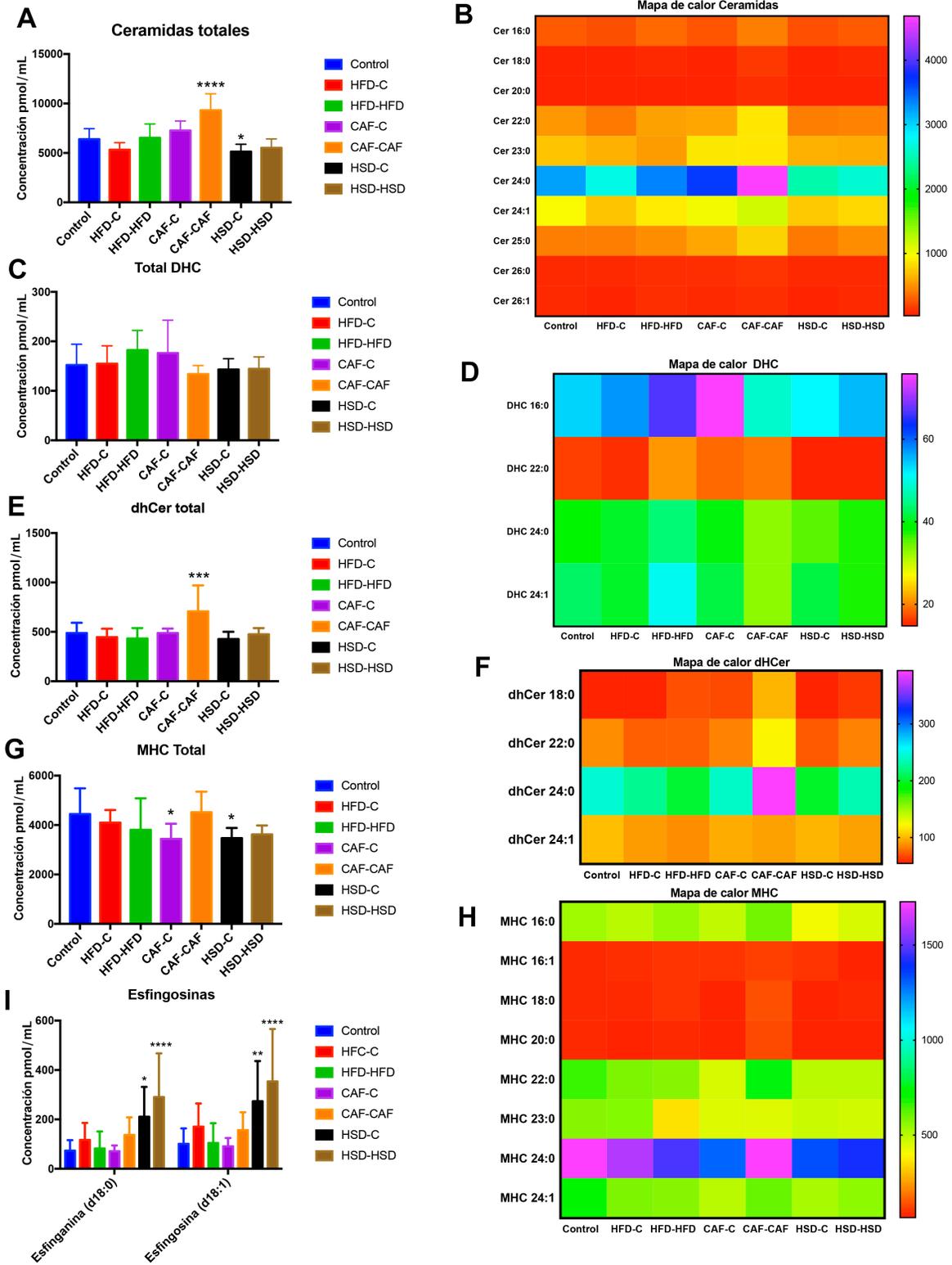


Figura 18. Concentración de Esfingolípidos en suero. A) Concentración de ceramidas totales. B) Mapa de calor de las concentraciones de ceramidas. C) Concentración de DHC totales. D) Mapa de calor de las concentraciones de DHC. E) Concentración de dhCer. F) Mapa de calor dhCer. G) Concentración de MHC Total. H) Mapa de calor MHC. I) Concentración de Esfingosinas.

totales. F) Mapa de calor de las concentraciones de dHCer. G) Concentración de MHC totales. H) Mapa de calor de las concentraciones de MHC. I) Concentraciones de esfingosinas. Se muestran los promedios \pm SD. Se realizó una prueba de ANOVA de dos vías más una prueba post hoc de Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$). Se muestran los promedios \pm SD. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

8.2.4 Concentración de ceramidas en pacientes obesos y pacientes obesos con DMT2

Además de los resultados de la descendencia de ratas, se cuantificó el perfil lipídico de ceramidas en pacientes obesos y pacientes obesos con DMT2, para determinar si se encontraban alteradas en concentración las ceramidas aumentadas en nuestro modelo de programación materna. Encontramos que en hombres con obesidad y DMT2 aumentó la concentración de Cer 24:0 en comparación al grupo de hombres obesos sin DMT2 (Fig. 19 A). Este aumento no se pudo determinar en las mujeres obesas con DMT2 (Fig. 19 B).

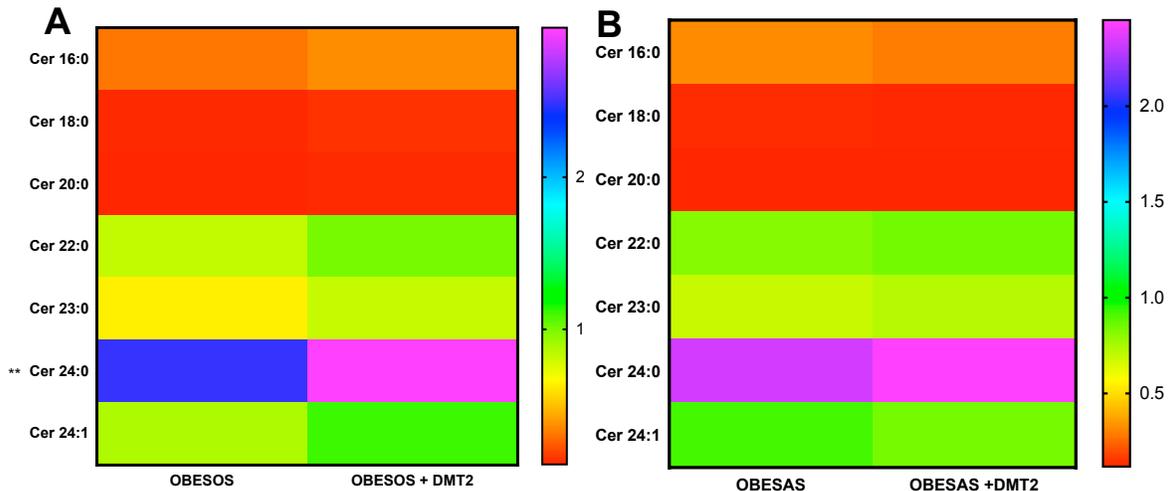


Figura 19. Mapa de calor de las concentraciones de ceramidas en pacientes obesos y obesos con DMT2. A) Concentraciones de ceramidas en hombres obesos y obesos con DMT2, se pueden observar cambios en la concentración del la Cer 24:0. B) Concentraciones de ceramidas en mujeres obesas y obesas con DMT2. Se realizó una prueba de ANOVA de dos vías más una prueba post hoc de Tukey (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$). Se muestran los promedios \pm SD.

8.3 La exposición a las dietas hipercalóricas durante la gestación y lactancia promueve estrés del RE y cambios en la dinámica de fusión y fisión mitocondrial en el hipotálamo de la descendencia masculina

En esta etapa del proyecto, a partir de los hipotálamos extraídos de los diversos grupos experimentales, se identificó el efecto específico de la programación materna nutricional en la dinámica RE-mitocondria y fusión-fisión mitocondrial. Se encontró que la programación materna con HFD-C causa un decremento y un aumento en la expresión de los genes *Hspa5* e *Ip3r1*, respectivamente (Fig. 20 A y C). Estos genes están relacionados con la activación de estrés de RE e interacción de RE con mitocondria. Además, la exposición de la descendencia a dieta de la madre, presente en los grupos HFD-HFD y CAF-CAF, incrementa los niveles de ARNm *Ip3r1* en el hipotálamo (Fig. 20 C). Por su parte, la exposición de dietas hipercalóricas durante la etapa perinatal y después del destete de la descendencia promueven el decremento de los niveles de ARNm de la proteína de fusión mitocondrial *Mfn2* (Fig. 20 B). No se encontraron diferencias significativas en la expresión del ARNm de *Drp1* y *Opa1* (Fig. 20 D y E). Finalmente, el análisis de la expresión de proteínas de fusión y fisión mitocondrial *DRP1* y *MFN2*, demostró decremento de los niveles de *DRP1* en los grupos HFD-C, HFD-HFD y HSD-HSD (Fig. 20 F y H) e incremento de *MFN2* en los grupos HFD-C, HFD-HFD, CAF-CAF y HSD-HSD (Fig. 20 G y H).

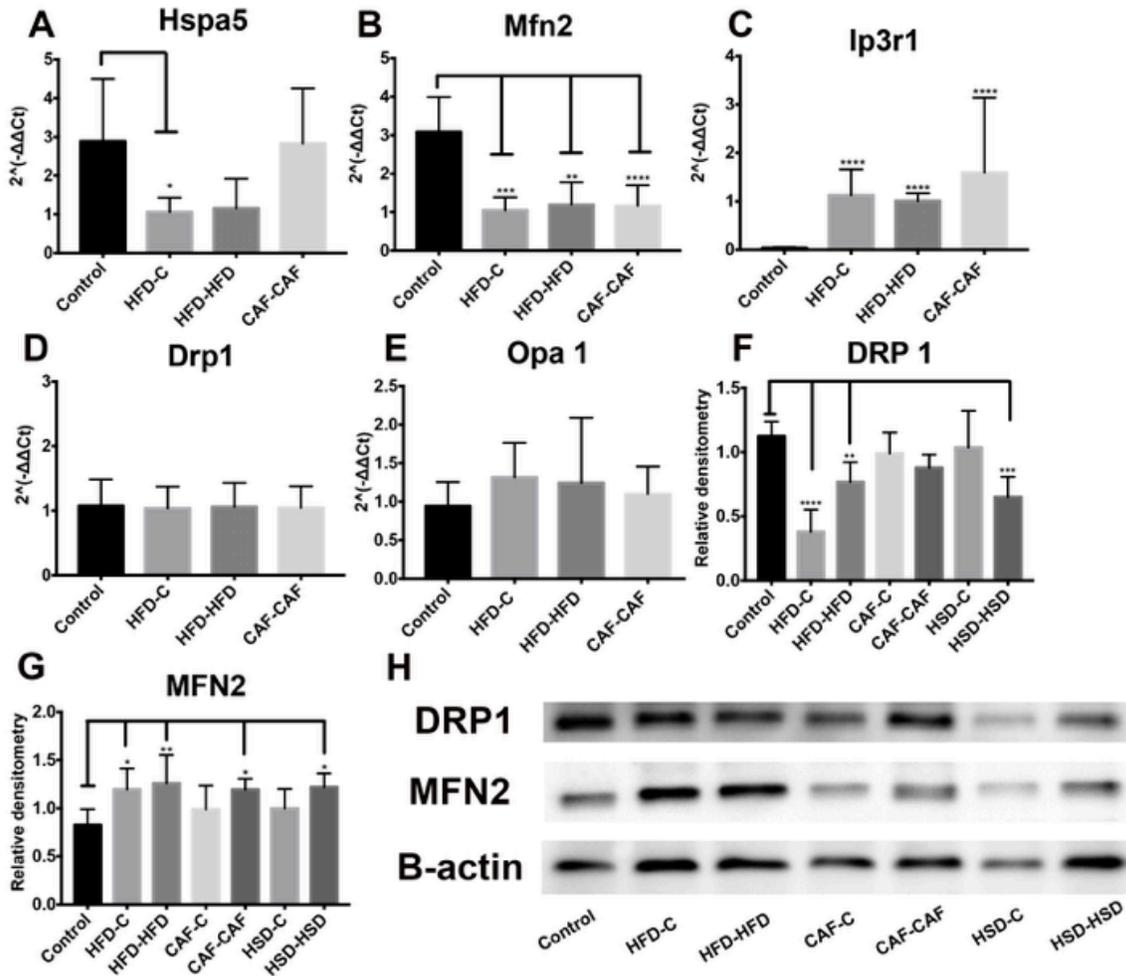


Figura 20. Efecto de la programación materna nutricional en el RE y en la fusión y fisión mitocondrial en la expresión de ARNm y proteína en el hipotálamo de la descendencia. **A)** Expresión del ARNm de Hspa5 **B)** Expresión del ARNm de Mfn2 **C)** Expresión del ARNm de Ip3r1 **D)** Expresión del ARNm de Drp1 **E)** Expresión del ARNm de Opa1 **F) y H)** Expresión de la proteína DRP1 **G) y H)** Expresión de la proteína MFN2. Se muestran los promedios \pm SD. Para la expresión de genes se realizó una prueba t de student y para la expresión de proteínas una ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

8.4.1 La dieta CAF durante la gestación y lactancia más una segunda exposición después del destete promueve alteraciones morfológicas en la dinámica del RE y mitocondria

Finalmente, identificamos las alteraciones morfológicas del ER-mitocondria empleando MET. Los resultados indican que la programación y exposición después del destete con dieta CAF, similar al grupo CAF-CAF, incrementa la desorganización del RE y el tamaño de las mitocondrias en el hipotálamo de la descendencia. Estos resultados indican la presencia de un incremento en los

contactos entre el RE-mitocondria, confirmando los resultados a nivel molecular y proponiendo que la exposición a dietas hipercalóricas durante la programación fetal y después del destete de la descendencia promueven fusión mitocondrial y disfunción del RE (Fig. 21 A, B, C, D).

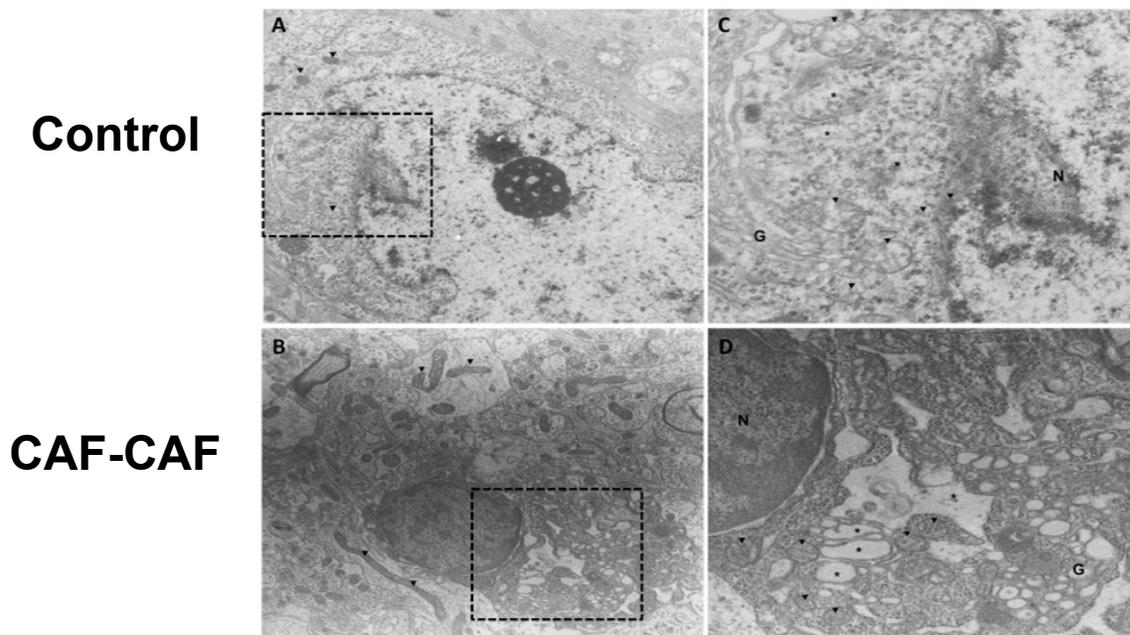


Figura 21. Efecto de la programación materna nutricional en la ultraestructura celular del hipotálamo de la descendencia. A y B) Grupo control C y D) Grupo CAF-CAF, se puede observar que en este grupo las mitocondrias tienen mayor tamaño y una interacción mayor con el RE. Abreviaturas: N, núcleo; G, aparato de Golgi.

Los resultados previos han mostrado que la programación materna nutricional promueve un incremento en la fusión mitocondrial, un incremento en los niveles de ARNm del receptor $Ip3r1$ del RE y que exponer a la descendencia a la misma dieta que su madre después del destete, grupos CAF-CAF, muestra un aumento en los contactos de RE-mitocondria y de la fusión mitocondrial. Se ha reportado en otros tejidos que la obesidad promueve los contactos entre el RE y mitocondria y un aumento en el flujo de Ca^{2+} hacia la mitocondria (Arruda et al., 2014). Basándonos en esta evidencia, se analizó *in vitro* si la lipotoxicidad inducida por el PAL modula el flujo de Ca^{2+} del RE a la mitocondria desencadenando disfunción mitocondrial. Los resultados indican que la estimulación de células hipotalámicas, previamente cargadas con TMRM, con PAL por 1, 3, 6 y 12h,

inducen un decremento del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) a partir de las 6h, y exacerbación a las 12h (Fig. 21 A y B), lo cual indica que existe la presencia de disfunción mitocondrial. Para evaluar la masa mitocondrial y la función de RE, las neuronas fueron cargadas también con ER-Tracker Green, así se encontró que la masa mitocondrial disminuye en 1, 3 y 6h después de la estimulación con PAL y además, la fluorescencia del RE disminuía a 1 y 3h, recuperando el incremento posterior a 6h y volviendo a disminuir a las 12h, indicando estrés de RE (Fig. 22 A y B).

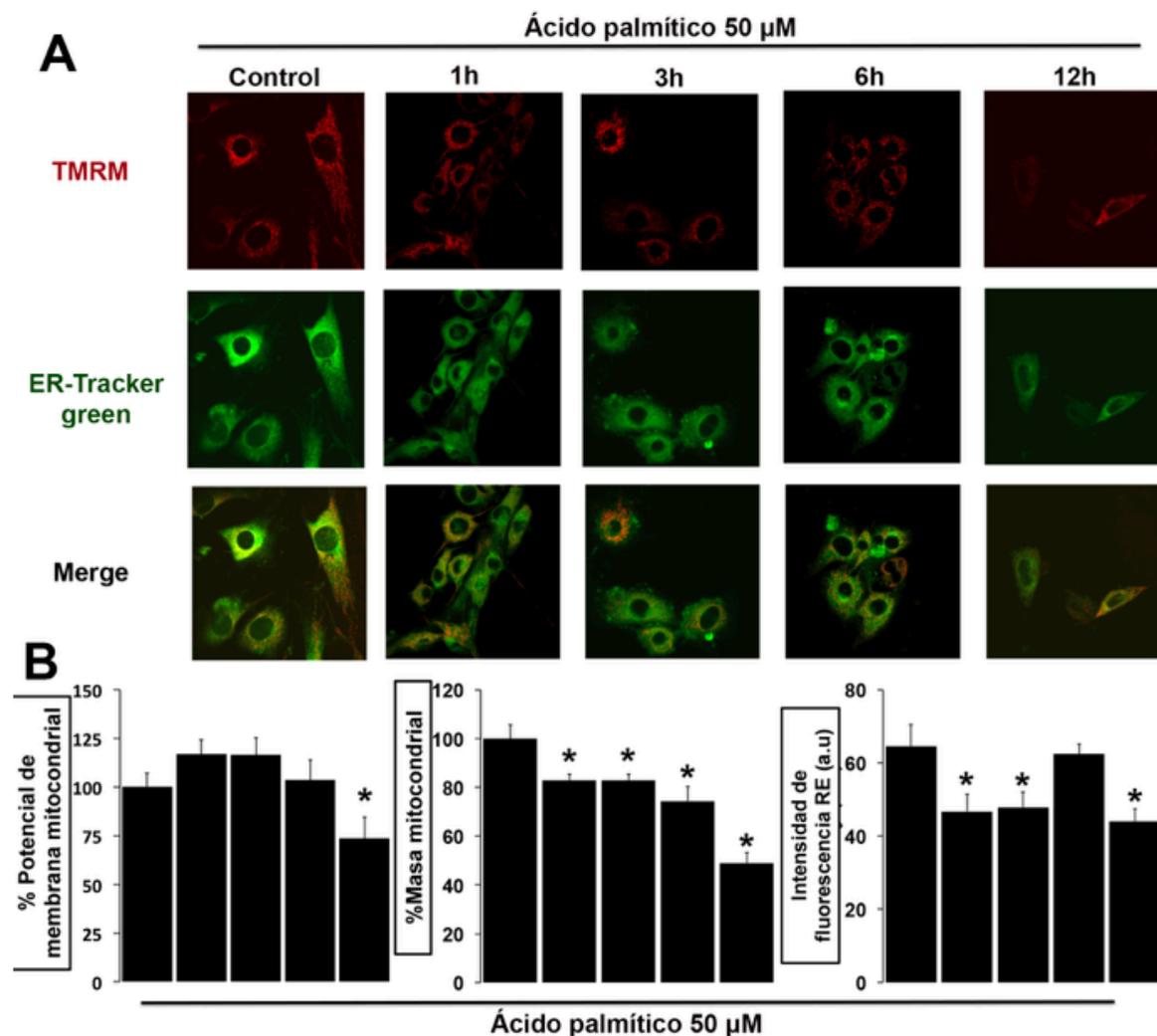


Figura 22. Lipotoxicidad inducida por PAL disminuye el $\Delta\Psi_m$, la masa mitocondrial y el estrés de RE. A) Imágenes representativas de microscopía confocal del $\Delta\Psi_m$, el cual fue medido por la retención de TMRM (rojo) y ER-Tracker Green para definir el citosol. **B)** Cuantificación del $\Delta\Psi_m$, porcentaje de masa mitocondrial e intensidad de fluorescencia del RE. Se muestran los promedios \pm SEM y los valores son de tres experimentos independientes (* $p < 0.01$).

Finalmente, se identificó si los cambios inducidos por PAL en los contactos entre RE-mitocondria y de función reticular o mitocondrial podrían estar ligados a alteraciones en la concentración de Ca^{2+} durante el estímulo lipotóxico. Con ello, los resultados indican que la estimulación de las células de hipotálamo con Pal durante 3 h incrementan la concentración de calcio en la mitocondria, evidenciado por un aumento en la fluorescencia (Fig. 23).

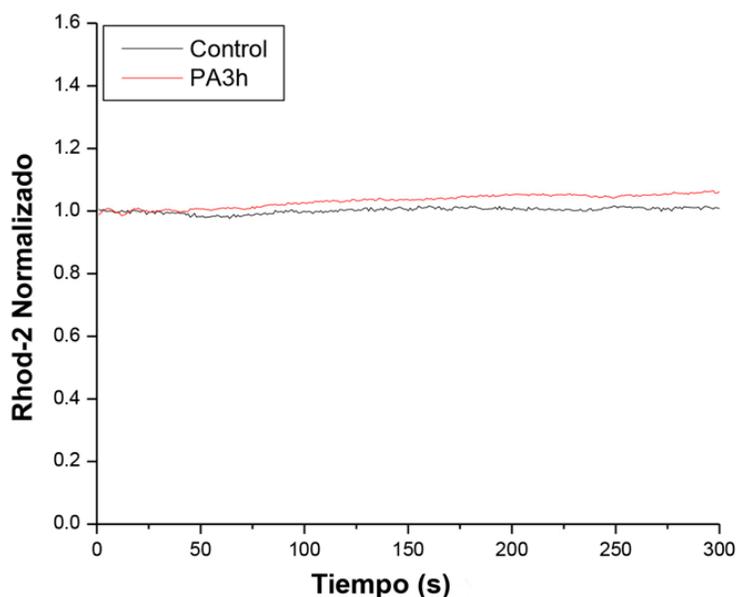


Figura 23. Lipotoxicidad del PAL induce cambios en los niveles de Ca^{2+} en la mitocondria. El Ca^{2+} mitocondrial después de 3 horas del estímulo con PAL, se muestran en el histograma los valores normalizados de la fluorescencia de Rhod-2 AM. Se muestran los promedios \pm SEM y los valores son de tres experimentos independientes.

9. Discusión

El presente proyecto se suscribe a descifrar los mecanismos celulares y metabólico-hormonales activados durante la programación nutricional por dietas hipercalóricas en las madres y su efecto en la generación de patologías metabólicas (obesidad-DMT2). En esta investigación mostramos evidencia científica del efecto deletéreo de la programación nutricional de madres por nutrientes hipercalóricos selectivos sobre la homeostasis metabólica-hormonal en plasma que correlaciona con cambios en el peso, consumo de alimento, sensibilidad a glucosa, insulina y leptina y alteraciones en las concentraciones

selectivas de diversas especies de lípidos. Además, extendemos la identificación de daño metabólico-hormonal y lo correlacionamos con alteraciones en la función/estructura y dinámica de RE-mitocondria en el hipotálamo. Nuestros resultados son los primeros reportados a la fecha que identifican perfiles lipidómicos selectivos asociados a programación fetal por nutrientes empleando la tecnología de lipidómica.

La obesidad y la sobrealimentación materna durante la gestación conducen a cambios metabólicos que incrementan la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades crónicas en la descendencia que incluyen a la DMT2 (McPherson et al., 2015; Saben et al., 2016; L. L. Wu et al., 2015; Zambrano et al., 2016). En este trabajo se identificaron alteraciones selectivas en parámetros metabólicos, perfil lipidómico y marcadores de disfunción mitocondrial y de estrés del RE dependiendo del tipo de dieta calórica empleada. Consideramos que gran parte de estos efectos son debidos en primera instancia, al porcentaje de lípidos vs azúcares que presentan dichas dietas, y por otro lado, al tiempo de exposición a la que se sometió al modelo animal, que incluye 9 semanas para la programación fetal en comparación con 14 semanas en la exposición después del destete (Melo et al., 2014; Pomar et al., 2017).

9.1 La programación nutricional por dietas HFD y CAF favorecen la hiperfagia y promueven la presencia de alteraciones metabólico-hormonales en la descendencia

La obesidad y la sobrenutrición materna durante la gestación conducen a cambios metabólicos que favorecen la aparición de enfermedades crónicas en la descendencia, incluidas el desarrollo de DMT2 (Zambrano et al., 2016). Los resultados iniciales identificaron que las madres expuestas a dieta CAF en la etapa de gestación muestran incremento de peso corporal. Además, el efecto de la alimentación materna por dieta CAF o dieta HSD en la descendencia, muestra decremento y aumento de peso corporal al nacimiento, respectivamente, respecto al grupo control. La sobrealimentación materna y/o obesidad impactan en la supervivencia de la descendencia

(McPherson et al., 2015; L. L. Wu et al., 2015), además de incrementar el peso de ratas y primates no humanos (Melo et al., 2014; Reginato et al., 2016; Sullivan et al., 2017). Aunque contrariamente en un reciente metanálisis se ha mostrado que la dieta HFD incrementa el peso en la descendencia masculina, además de mostrar una tendencia de bajo peso al nacer (Ribaroff, Wastnedge, Drake, Sharpe, & Chambers, 2017), de cualquier manera la exposición materna a dietas hipercalóricas altera el peso al nacer con posibles implicaciones en el crecimiento postnatal.

Posteriormente, se analizó el efecto de la alimentación materna en el peso corporal de la descendencia en la etapa adolescente. Los datos demuestran que la dieta HFD (grupo HFD-C) incrementa el peso corporal de la descendencia; sin embargo, la exposición secuencial de HFD o CAF (grupos HFD-HFD o CAF-CAF) promueven el decremento de peso corporal comparado con el grupo control. De interés, al menos para la exposición de la descendencia a CAF (grupo CAF-CAF), se muestra un incremento en el consumo de alimento, pero decremento en el peso, reflejando desajuste en el gasto energético, similar al demostrado durante la exposición a dieta HFD (grupo HFD-HFD). Apoyando estos resultados, las fórmulas de dieta CAF decrecen la tasa de crecimiento (Prats, Monfar, Castella, Iglesias, & Alemany, 1989); pero también, la programación con dieta HFD incrementan el peso en la descendencia de ratones, tentativamente asociada con hiperfagia (Kirk et al., 2009; White, Purpera, & Morrison, 2009). Estos resultados sugieren que la programación metabólica por dietas HFD o CAF consumidas durante la etapa perinatal establece un umbral de susceptibilidad al desarrollo de disfunción metabólica en la descendencia que favorece el desarrollo de hiperfagia temprana.

Además de los cambios en el peso corporal identificados, la programación por dieta CAF o dieta HFD, disminuye o incrementa durante la GTT o ITT, respectivamente, los niveles de glucosa en el plasma de la descendencia. Nuestros datos correlacionan con estudios anteriores mostrando incremento de

glucosa por programación con dieta de HFD en la descendencia (Desai et al., 2014). Adicionalmente, los estímulos hipercalóricos de HFD o CAF después del destete de la descendencia inducen incremento en las concentraciones de insulina y leptina, que correlaciona con el incremento de tejido adiposo retroperitoneal y el decremento en el peso del hígado, comparado con el grupo control. Nuestros resultados concuerdan con reportes previamente mostrados comprobando incremento en las concentraciones de insulina y leptina en ratas jóvenes y ratas obesas sometidas a dieta HFD (Eu, Lim, Ton, & bin Abdul Kadir, 2010; Lanza et al., 2014; Suárez-García et al., 2017). **En su conjunto, proponemos que los cambios en los perfiles metabólico-hormonales identificados, asociados a la programación nutricional materna se integran en un marco de tiempo que se hacen presentes a partir de la etapa adolescente y se manifiesta en la adultez (Tabla 7).**

| | HFD-C | HFD-HFD | CAF-C | CAF-CAF | HSD-C | HSD-HSD |
|---|-------|---------|-------|---------|-------|---------|
| Cambio en el peso | ↑ | = | = | ↓ | = | = |
| Cambio en el consumo de alimento | = | ↓ | = | = | = | = |
| Incremento glucosa basal | ↑ | = | = | = | = | = |
| AUC GTT | = | = | ↓ | = | = | = |
| AUC ITT | ↑ | = | = | = | = | = |
| Incremento insulina | ↑ | ↑ | = | ↑ | = | = |
| Incremento leptina | = | ↑ | ↑ | ↑ | = | = |
| Cambio peso tejido adiposo | ↑ | ↑ | = | ↑ | = | ↑ |
| Cambio peso hígado | = | ↓ | = | = | = | = |
| Cambios en las concentraciones en TG y DG | = | = | = | ↑ | ↓ | ↓ |
| Cambios en las concentraciones de ceramidas | ↓ | = | = | ↑ | ↓ | = |

Tabla 7. Resumen de resultados metabólicos de los diferentes grupos.

9.2 Identificación del firmas lipídicas selectivas durante el daño lipotóxico en la descendencia de madres expuestas a programación nutricional

Quizás, uno de los mayores aportes de nuestro trabajo, sea la identificación del perfil lipídico en nuestros modelos animales de programación fetal. Como comentamos inicialmente, nuestro proyecto representa el primer trabajo en México que implementa el uso de la tecnología de lipidómica para la identificación de firmas lipídicas en modelos de daño metabólico-hormonal.

De manera general, a diferencia de las dieta CAF o HSD, la programación metabólica por la dieta HFD durante la etapa perinatal, promueve un incremento en las concentraciones totales de diacilglicéridos, con respecto al control. A nivel individual, las especies de diacilglicéridos que mostraron incremento representan aquellos con dos cadenas de lípidos insaturadas de ácidos grasos esenciales: el ácido linoleico (18:2) y araquidónico (20:4), además, del no esencial oleico (18:1). Estas especies de lípidos que representan formas intermedias de los triglicéridos han llamado la atención por ser agentes lipotóxicos (Chaurasia & Summers, 2015). En modelos murinos alimentados con dietas altas en grasas, muestran incremento de diacilglicéridos en músculo e hígado, que se asocia a la inhibición de la señal de insulina (Shulman, 2014; Ter Horst et al., 2017).

Nuestro modelo de programación nutricional materna da evidencia de que las alteraciones en el perfil lipídico, a excepción del incremento de diacilgliceridos comentado, no son evidentes en la descendencia en la edad adolescente. Sin embargo, si se continua exponiendo al modelo murino a una dieta de CAF después del destete, el sistema se compromete a tal grado que se promueve incremento en los niveles totales de triglicéridos, ceramidas y dhceramidas. En este contexto, de las 57 especies de triglicéridos analizadas en la programación por dieta CAF, se demostró el incremento de 10 especies y la disminución de 2, que contienen por lo menos una insaturación en una de sus cadenas. Mientras que la programación por la dieta de HFD después del destete (grupo HFD-HFD) muestra un aumento de 7 especies y una disminución de 2, coincidiendo en este decremento en el TG(22:6/36:3) presentado por la dieta de CAF (grupo CAF-CAF). Por su parte, la programación materna con la dieta CAF

aumentó los niveles de ceramidas específicas del tipo 22:0, 24:0 y 25:0. Interesantemente, la ceramida 24:0 también aumentó en el grupo HFD-HFD. Se ha reportado que en pacientes con resistencia a insulina y obesidad hay un aumento de las ceramidas 16:1 y 20:4 (T. et al., 2016). Cer 24:0 y 24:1 están relacionadas con la acción de la ceramida sintetasa 2 y estas ceramidas están relacionadas con apoptosis e inhibición de la proliferación celular (Hartmann et al., 2012), y es marcador de resistencia a insulina en modelos animales (Turpin et al., 2014). Por su parte, las ceramidas tienen una estructura similar a los diacilglicéridos y son las estructuras parentales de todos los esfingolípidos, derivando de las ceramidas las esfingomielinas, glicosfingolípidos, cerebrósidos, globósidos y gangliósidos (Nelson, Lehninger, & Cox, 2008).

Las ceramidas forman parte de los componentes integrales de la membrana celular y coordinan la respuesta al estrés celular inhibiendo el crecimiento, el anabolismo y llevando a la célula a apoptosis (Chaurasia & Summers, 2015), siendo con ello de gran relevancia en trastornos metabólicos. Además, otros esfingolípidos asociados a las ceramidas son las DhCer que se obtiene a partir de la síntesis de novo por medio de las ceramida sintetasas (Reali et al., 2017). Específicamente, las especies dHCer 18:0, 24:0 muestran incremento después de la programación con dieta CAF. Las DhCer que se obtienen pueden pasar a ser ceramidas por medio de la dihidroceramida desaturasa (DEGS1) que es el último paso en la vía biosintética de las ceramidas (Barbarroja et al., 2014). Se ha reportado que en modelos murinos obesos DEGS1 está subexpresado y su función es importante en la proliferación celular, supervivencia y estrés oxidativo en adipocitos siendo necesaria para la acumulación de lípidos en los adipocitos maduros (Barbarroja et al., 2014). De tal forma que la programación por dieta CAF podría estar relacionada con una desregulación en DEGS1. En su conjunto, el aumento en la concentración de triglicéridos, diacilglicéridos y ceramidas, son sin lugar a dudas, especies lipídicas con potenciales marcadores de síndrome metabólico y lipotoxicidad en humanos, asociados con el desarrollo de DMT2 (Engin, 2017).

Finalmente, nuestros datos también identificaron un efecto selectivo en el perfil de lípidos, ejercido por la programación nutricional empleando la dieta de HSD, que está ausente en la HFD y CAF. Las especies selectivas que incrementan son esfinganina d18:0 y esfingosina d18:1, representan estructuras químicas precursoras de las ceramidas. En pacientes con hígado graso se ha visto que los valores de estos esfingolípidos aumentan (Fig. 18) (Apostolopoulou et al., 2017). La Fig. 24 resume los mayores cambios en las especies de lípidos identificadas por lipidómica en el modelo de programación materna por dietas selectivas.

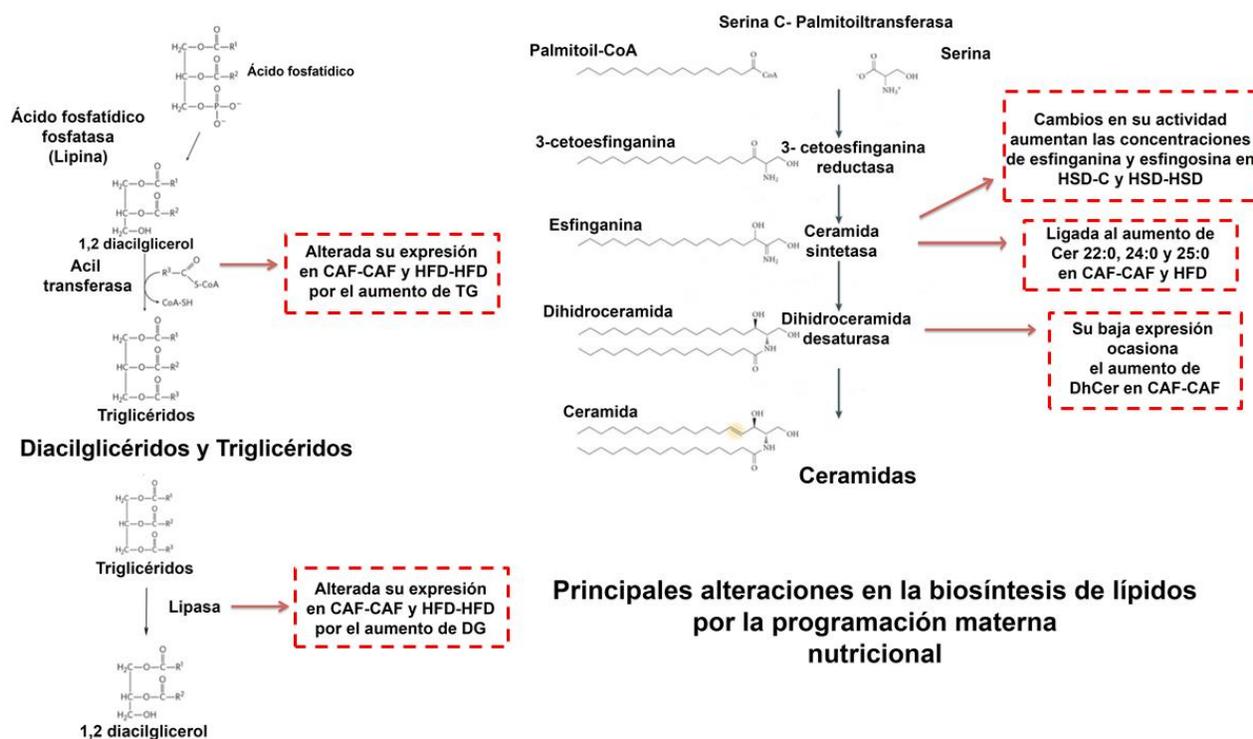


Figura 24. Principales vías de biosíntesis de lípidos alteradas por la programación materna y el consumo por parte de la descendencia de dietas hipercalóricas. Podemos observar que podría haber alteración en enzimas como la lipina y la acil tranferasa, por los cambios en las concentraciones de triglicéridos, además de cambios en la lipasa por el aumento de los diacilglicéridos. Por otro lado, en el caso de las ceramidas el aumento de ceramidas como la Cer 24:0 puede deberse a cambios en la expresión de la ceramida sintetasa. En humanos se han asociado estas vías con el desarrollo de DMT2, y esto también podría estar relacionado con lo observado en los pacientes obesos y con DMT2 que hubo un aumento de Cer 24:0.

9.2.1 La Cer 24:0 incrementa en pacientes con obesidad y DMT2

En pacientes se ha determinado que el incremento de especies de ceramidas produce resistencia a insulina y es independiente de la obesidad, condición física, ácidos grasos libres o diacilglicéridos (Amati et al., 2011; Dube et al., 2011). Sin embargo, las concentraciones de palmitato como las hormonas y el microbioma modifican las tasas de síntesis y degradación de ceramidas (Benjamin T. Bikman & Summers, 2011; William L. Holland et al., 2011; William L Holland et al., 2007).

Por otro lado, las ceramidas son conocidas por inhibir la vía de ATK. Sin embargo, AKT puede ser restablecida si se bloquea a las enzimas SPT, CERS o DES1 que son de gran importancia en la producción de ceramidas por la vía de novo (Benjamin T Bikman et al., 2012). Ejemplos de este rescate es el uso del inhibidor de la enzima SPT myriocina y el inhibidor de DES fenretinida, que causan que se mejore la sensibilidad a la insulina (Kurek et al., 2014). Las ceramidas podrían inhibir a la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (Raichur et al., 2014). Con respecto a la Cer 24:0 recientemente en cardiomiocitos, se ha relacionado a las ceramidas de cadena larga como Cer 24:0 como causa de disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y muerte celular (Law et al., 2018).

9.3 La programación materna por exposición a dietas hipercalóricas HFD y CAF incrementa la fusión mitocondrial en el hipotálamo de la descendencia

La programación metabólica de la descendencia durante la sobrealimentación materna lleva a la activación del estrés de RE (Ma, Huang, Yang, & Liang, 2016; McPherson et al., 2015; L. L. Wu et al., 2015) y afecta el metabolismo de glucosa en la descendencia masculina (Chen, Simar, & Morris, 2014). Se sabe que la dinámica mitocondrial es regulada por la demanda bioenergética (Srinivasan, Guha, Kashina, & Avadhani, 2017).

En esta parte del proyecto, integramos las observaciones identificadas en el perfil metabólico-hormonal de la descendencia con su efecto correlativo en la activación de estrés del RE y daño mitocondrial en el sistema nervioso. En este

sentido, se conoce que la programación materna por sobrealimentación o por obesidad desencadena la activación del estrés de RE y disfunción mitocondrial en ovocitos y embriones (McPherson et al., 2015; L. L. Wu et al., 2015) e inclusive puede afectar el metabolismo de glucosa hipotalámico en la descendencia masculina (Chen et al., 2014). Nuestros resultados añaden nueva evidencia mostrando que los grupos HFD-C, HFD-HFD, CAF-CAF y HSD-HSD decrecen la expresión del marcador de fisión mitocondrial DRP1 e incrementan el marcador de fusión mitocondrial MFN2 en el hipotálamo de la descendencia. De interés, este resultado correlaciona con el obtenido empleando TEM que muestra incremento de contactos entre RE-mitocondria y en el número y tamaño de mitocondrias en el grupo CAF-CAF. Se ha reportado que la regulación a la alta de MFN2 en ratones obesos y defectos en la expresión de la MFN2 hipotalámica en las neuronas POMC y Agrp promueve o previene la obesidad (Dietrich et al., 2013; Schneeberger et al., 2013), respectivamente, y nosotros hemos demostrado la regulación a la alta en el hipotálamo empleando un modelo de obesidad en ratones (Diaz et al., 2015). Además, se sabe que la obesidad activa cambios en la morfología mitocondrial en el hígado e incrementa las uniones entre RE-mitocondria (Arruda et al., 2014; Diaz et al., 2015), sugiriéndose que la regulación de MFN2 puede influenciar en la susceptibilidad de ganar más peso durante el crecimiento (Enos, Velázquez, & Murphy, 2014). Un incremento en la fusión mitocondrial y/o aumento de los contactos entre RE-mitocondria son moduladores negativos del metabolismo mitocondrial, en parte por aumento en la liberación de calcio del RE y sobrecarga en la mitocondria (Arruda et al., 2014; Pennanen et al., 2014). Con ello, empleando un modelo in vitro de células de hipotálamo demostramos que la estimulación con ácido palmítico, induce estrés de RE que correlaciona con un decremento en el potencial de membrana y masa mitocondrial. De interés, la estimulación con ácido palmítico incrementa las concentraciones de Ca^{2+} mitocondrial a tiempos tempranos de la disfunción mitocondrial. Esto apoya la hipótesis que un estímulo lipotóxico con ácido palmítico promueve la liberación de Ca^{2+} inicial del RE a la matriz mitocondrial y posiblemente induce el desarrollo de disfunción mitocondrial. Estos resultados

también concuerdan con el incremento de la expresión de Ip3r1 identificado en nuestro modelo de dietas hipercalóricas maternas, lo que muestra un papel importante del flujo de Ca^{2+} del RE a la mitocondria (Arruda et al., 2014; Muñoz et al., 2013; Naon et al., 2016; Pennanen et al., 2014). Los datos obtenidos en este contexto, demuestran que la programación materna nutricional induce la sobrerregulación de la fusión mitocondrial en el hipotálamo de la descendencia, probablemente implicada en la disfunción mitocondrial asociada a la sobrecarga de calcio demostrada en los experimentos *in vitro*.

9.4 El ácido palmítico incrementa la interacción entre el RE-mitocondria lo que causa un aumento del Ca^{2+} del RE hacia la mitocondria en un modelo *in vitro* de neuronas de hipotálamo

Por último, se probó la hipótesis que si el incremento de la fusión mitocondrial y aumento de los contactos entre el RE y mitocondria son moduladores negativos del metabolismo mitocondrial (Fig. 25). Se ha reportado que el inicio de la disfunción mitocondrial es secundario al estrés de RE y la liberación de Ca^{2+} (Naon et al., 2016). Inicialmente, se había determinado que el HFD-C mostró un decremento de la expresión de Hspa5 y los grupos HFD-C, HFD-HFD y CAF-CAF incrementaron la expresión de Ip3r1, marcadores de estrés de RE y de calcio. Identificamos que la estimulación con ácido palmítico en las células de hipotálamo promueve estrés de RE, que correlaciona con un decremento en el potencial de membrana y masa mitocondrial a las 6 h. Interesantemente, la estimulación con ácido palmítico incrementa las concentraciones de Ca^{2+} a tiempos tan tempranos como 3 h posteriores al tratamiento. Esto apoya la hipótesis que la estimulación lipotóxica con ácido palmítico promueve la liberación inicial de Ca^{2+} del RE hacia la matriz mitocondrial y tentativamente promueve la disfunción mitocondrial. **Nuestros resultados correlacionan con el incremento de la expresión de Ip3r1 en las dietas hipercalóricas maternas y fortalecen la propuesta de que tal disfunción permite el flujo de Ca^{2+} del RE a la mitocondria** (Arruda et al., 2014; Muñoz et al., 2013; Naon et al., 2016).

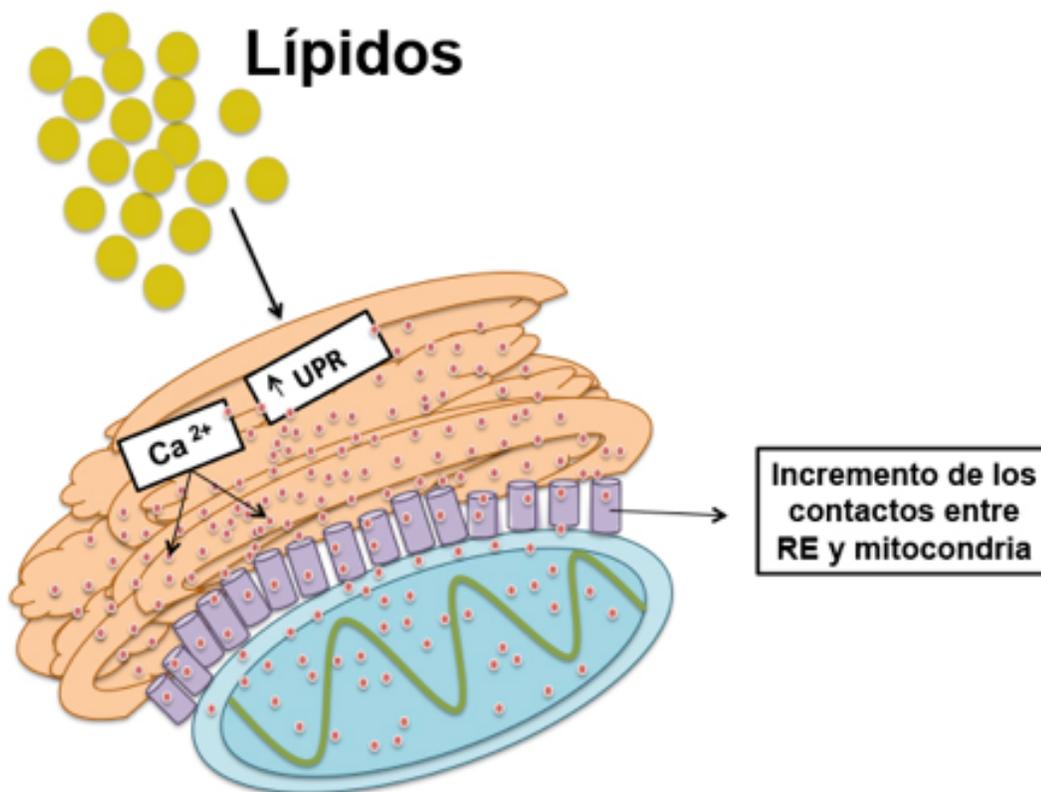


Figura 25. Hipótesis del modelo del flujo de calcio del RE a la mitocondria y sus complicaciones metabólicas durante la lipotoxicidad.

10. Conclusiones

La alimentación materna con dietas HFD, CAF o HSD incrementan las concentraciones de insulina y leptina en suero en la descendencia. Por otro lado, la exposición a HFD es potencialmente más efectiva en promover la fusión mitocondrial, estrés de RE y daño mitocondrial en la descendencia masculina. Los daños de exposición por dieta son replicados cuando se expone a la descendencia a las dietas HFD, CAF y HSD después del destete mostrando aumento de marcadores de lipotoxicidad, que incluyen diferentes especies de esfingolípidos entre ellos las ceramidas y los diacilglicéridos, ambas especies de lípidos importantes en la señalización celular de insulina. Estos datos correlacionan con el desbalance en la sensibilidad a glucosa, insulina, leptina y la acumulación de grasa después de una exposición a las dietas HFD y CAF. El mecanismo que

podría estar relacionado es la disfunción mitocondrial por sobrecarga de Ca^{2+} del RE a la mitocondria debido al aumento de especies de lípidos lipotóxicas.

11. Perspectivas

- Analizar en la etapa adulta la expresión de los genes que regulan las dinámicas mitocondriales en el hipotálamo.
- Estudiar patrones de expresión y metilación de genes que regulan el metabolismo de los lípidos en la descendencia después del consumo de dieta HFD o CAF.
- Analizar en un modelo *in vitro* e *in vivo*, las alteraciones causadas por ácido palmítico y ceramidas en la interacción RE-mitocondria y si pueden mejorarse por fármacos que mejoran la dinámica mitocondrial.

12. Referencias

- Adams, J. M., Pratipanawatr, T., Berria, R., Wang, E., DeFronzo, R. A., Sullards, M. C., & Mandarino, L. J. (2004). Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes*, 53(1), 25-31.
- Aguer, C., McCain, C. S., Knotts, T. A., Thrush, A. B., Ono-Moore, K., McPherson, R., . . . Harper, M.-E. (2015). Acylcarnitines: potential implications for skeletal muscle insulin resistance. *The FASEB Journal*, 29(1), 336-345.
- Aiken, C. E., & Ozanne, S. E. (2014). Transgenerational developmental programming. *Human Reproduction Update*, 20(1), 63-75. doi:10.1093/humupd/dmt043
- Amati, F., Dubé, J. J., Alvarez-Carnero, E., Edreira, M. M., Chomentowski, P., Coen, P. M., . . . Toledo, F. G. (2011). Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes? *Diabetes*, 60(10), 2588-2597.
- Anjani, K., Lhomme, M., Sokolovska, N., Poitou, C., Aron-Wisnewsky, J., Bouillot, J.-L., . . . Clement, K. (2015). Circulating phospholipid profiling identifies portal contribution to NASH signature in obesity. *Journal of hepatology*, 62(4), 905-912.
- Apostolopoulou, M., Gordillo, R., Koliaki, C., Gancheva, S., Jelenik, T., Herder, C., . . . Roden, M. (2017). Serum and hepatic sphingolipids relate to insulin resistance, hepatic mitochondrial capacity and oxidative stress in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetologie und Stoffwechsel*, 12(S 01), FV58.
- Archer, S. L. (2013). Mitochondrial Dynamics — Mitochondrial Fission and Fusion in Human Diseases. *New England Journal of Medicine*, 369(23), 2236-2251. doi:10.1056/NEJMra1215233

- Arruda, A. P., Pers, B. M., Parlakgöl, G., Güney, E., Inouye, K., & Hotamisligil, G. S. (2014). Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum–mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nature medicine*, *20*(12), 1427.
- Bach, D., Pich, S., Soriano, F. X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., . . . Zierath, J. R. (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism A novel regulatory mechanism altered in obesity. *Journal of biological Chemistry*, *278*(19), 17190-17197.
- Barbarroja, N., Rodriguez-Cuenca, S., Nygren, H., Camargo, A., Pirraco, A., Relat, J., . . . Lopez-Pedrerá, C. (2014). Increased dihydroceramide/ceramide ratio mediated by defective expression of degs1 impairs adipocyte differentiation and function. *Diabetes*, DB_140359.
- Barker, D. J. (1990). The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ: British Medical Journal*, *301*(6761), 1111.
- Barrera-Cruz, A., Rodríguez-González, A., & Molina-Ayala, M. A. (2013). Escenario actual de la obesidad en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, *51*(3), 292-299.
- Baskin, D. G. (2015). Leptin interaction with brain orexigenic and anorexigenic pathways *Leptin* (pp. 25-37): Springer.
- Biden, T. J., Boslem, E., Chu, K. Y., & Sue, N. (2014). Lipotoxic endoplasmic reticulum stress, β cell failure, and type 2 diabetes mellitus. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *25*(8), 389-398.
- Bikman, B. T., Guan, Y., Shui, G., Siddique, M. M., Holland, W. L., Kim, J. Y., . . . Summers, S. A. (2012). Fenretinide prevents lipid-induced insulin resistance by blocking ceramide biosynthesis. *Journal of biological Chemistry*, *287*(21), 17426-17437.
- Bikman, B. T., & Summers, S. A. (2011). Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *The Journal of Clinical Investigation*, *121*(11), 4222-4230. doi:10.1172/JCI57144
- Borg, M. L., Omran, S. F., Weir, J., Meikle, P. J., & Watt, M. J. (2012). Consumption of a high-fat diet, but not regular endurance exercise training, regulates hypothalamic lipid accumulation in mice. *The Journal of physiology*, *590*(17), 4377-4389.
- Boucher, J., Kleinridders, A., & Kahn, C. R. (2014). Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(1), a009191. doi:10.1101/cshperspect.a009191
- Bournat, J. C., & Brown, C. W. (2010). Mitochondrial dysfunction in obesity. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, *17*(5), 446.
- Brice, S. E., & Cowart, L. A. (2011). Sphingolipid Metabolism and Analysis in Metabolic Disease. In L. A. Cowart (Ed.), *Sphingolipids and Metabolic Disease* (pp. 1-17). New York, NY: Springer New York.
- Camacho, A., Huang, J. K., Delint-Ramirez, I., Yew Tan, C., Fuller, M., Lelliott, C. J., . . . Franklin, R. J. (2013). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-coactivator-1 alpha coordinates sphingolipid metabolism, lipid raft

- composition and myelin protein synthesis. *European Journal of Neuroscience*, 38(5), 2672-2683.
- Camacho, A., Rodriguez-Cuenca, S., Blount, M., Prieur, X., Barbarroja, N., Fuller, M., . . . Vidal-Puig, A. (2012). Ablation of PGC1 beta prevents mTOR dependent endoplasmic reticulum stress response. *Experimental neurology*, 237(2), 396-406.
- Cárdenas-Pérez, R., & Camacho, A. (2016). Roles of calcium and Mitochondria-Associated Membranes in the development of obesity and diabetes. *Medicina universitaria*, 18(70), 23-33.
- Cardenas-Perez, R. E., Fuentes-Mera, L., de la Garza, A. L., Torre-Villalvazo, I., Reyes-Castro, L. A., Rodriguez-Rocha, H., . . . Zambrano, E. (2018). Maternal overnutrition by hypercaloric diets programs hypothalamic mitochondrial fusion and metabolic dysfunction in rat male offspring. *Nutrition & Metabolism*, 15(1), 38.
- Carobbio, S., Rodriguez-Cuenca, S., & Vidal-Puig, A. (2011). Origins of metabolic complications in obesity: ectopic fat accumulation. The importance of the qualitative aspect of lipotoxicity. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 14(6), 520-526.
- Chakraborty, M., & Jiang, X.-C. (2013). Sphingomyelin and its role in cellular signaling *Lipid-mediated Protein Signaling* (pp. 1-14): Springer.
- Chaurasia, B., & Summers, S. A. (2015). Ceramides—lipotoxic inducers of metabolic disorders. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(10), 538-550.
- Chen, H., Simar, D., & Morris, M. J. (2014). Maternal obesity impairs brain glucose metabolism and neural response to hyperglycemia in male rat offspring. *Journal of neurochemistry*, 129(2), 297-303.
- Cintra, D. E., Ropelle, E. R., Moraes, J. C., Pauli, J. R., Morari, J., de Souza, C. T., . . . Saad, M. J. (2012). Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PloS one*, 7(1), e30571.
- Cnop, M. (2008). Fatty acids and glucolipototoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes: Portland Press Limited.
- Cone, R. D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, 8, 571. doi:10.1038/nn1455
- Contreras, L., Drago, I., Zampese, E., & Pozzan, T. (2010). Mitochondria: the calcium connection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(6), 607-618.
- Das, P., Biswas, S., Mukherjee, S., & Bandyopadhyay, S. (2016). Association of Oxidative Stress and Obesity with Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus. *Mymensingh medical journal: MMJ*, 25(1), 148-152.
- de la Maza, M. P., Rodriguez, J., Hirsch, S., Leiva, L., Barrera, G., & Bunout, D. (2015). Skeletal muscle ceramide species in men with abdominal obesity. *The journal of nutrition, health & aging*, 19(4), 389-396.
- De Souza, C. u. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., . . . Velloso, L. c. A. (2005). Consumption of a Fat-Rich Diet Activates a Proinflammatory Response and Induces Insulin Resistance in the Hypothalamus. *Endocrinology*, 146(10), 4192-4199. doi:10.1210/en.2004-1520

- DeFalco, J., Tomishima, M., Liu, H., Zhao, C., Cai, X., Marth, J. D., . . . Friedman, J. M. (2001). Virus-assisted mapping of neural inputs to a feeding center in the hypothalamus. *Science*, *291*(5513), 2608-2613.
- Delint-Ramirez, I., Ruiz, R. M., Torre-Villalvazo, I., Fuentes-Mera, L., Ocañas, L. G., Tovar, A., & Camacho, A. (2015). Genetic obesity alters recruitment of TANK-binding kinase 1 and AKT into hypothalamic lipid rafts domains. *Neurochemistry international*, *80*, 23-32.
- Desai, M., Jellyman, J. K., Han, G., Beall, M., Lane, R. H., & Ross, M. G. (2014). Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, *211*(3), 237. e231-237. e213.
- Diaz, B., Fuentes-Mera, L., Tovar, A., Montiel, T., Massieu, L., Martínez-Rodríguez, Herminia G., & Camacho, A. (2015). Saturated lipids decrease mitofusin 2 leading to endoplasmic reticulum stress activation and insulin resistance in hypothalamic cells. *Brain Research*, *1627*(Supplement C), 80-89. doi:<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.014>
- Dietrich, M. O., Liu, Z.-W., & Horvath, T. L. (2013). Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins regulate Agrp neuronal activity and diet-induced obesity. *Cell*, *155*(1), 188-199.
- Drobnik, W., Liebisch, G., Audebert, F.-X., Fröhlich, D., Glück, T., Vogel, P., . . . Schmitz, G. (2003). Plasma ceramide and lysophosphatidylcholine inversely correlate with mortality in sepsis patients. *Journal of lipid research*, *44*(4), 754-761.
- Dube, J., Amati, F., Toledo, F., Stefanovic-Racic, M., Rossi, A., Coen, P., & Goodpaster, B. (2011). Effects of weight loss and exercise on insulin resistance, and intramyocellular triacylglycerol, diacylglycerol and ceramide. *Diabetologia*, *54*(5), 1147-1156.
- Dudas, B. (2013). *The Human Hypothalamus: Anatomy, Functions and Disorders*: Nova Science Publishers.
- Eizirik, D. L., Cardozo, A. K., & Cnop, M. (2007). The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocrine reviews*, *29*(1), 42-61.
- Engin, A. (2017). The Pathogenesis of Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation *Obesity and Lipotoxicity* (pp. 221-245): Springer.
- Enos, R. T., Velázquez, K. T., & Murphy, E. A. (2014). Insight into the impact of dietary saturated fat on tissue-specific cellular processes underlying obesity-related diseases. *The Journal of nutritional biochemistry*, *25*(6), 600-612.
- Eu, C. H. A., Lim, W. Y. A., Ton, S. H., & bin Abdul Kadir, K. (2010). Glycyrrhizic acid improved lipoprotein lipase expression, insulin sensitivity, serum lipid and lipid deposition in high-fat diet-induced obese rats. *Lipids in Health and Disease*, *9*(1), 81.
- Frias, A. E., Morgan, T. K., Evans, A. E., Rasanen, J., Oh, K. Y., Thornburg, K. L., & Grove, K. L. (2011). Maternal high-fat diet disturbs uteroplacental hemodynamics and increases the frequency of stillbirth in a nonhuman primate model of excess nutrition. *Endocrinology*, *152*(6), 2456-2464.
- Ginkel, C., Hartmann, D., vom Dorp, K., Zlomuzica, A., Farwanah, H., Eckhardt, M., . . . Dere, E. (2012). Ablation of neuronal ceramide synthase 1 in mice decreases ganglioside levels and expression of myelin-associated

- glycoprotein in oligodendrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(50), 41888-41902.
- Hartmann, D., Lucks, J., Fuchs, S., Schiffmann, S., Schreiber, Y., Ferreirós, N., . . . Grösch, S. (2012). Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(4), 620-628. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.019>
- Hein, L. K., Duplock, S., Hopwood, J. J., & Fuller, M. (2008). Lipid composition of microdomains is altered in a cell model of Gaucher disease. *Journal of lipid research*, 49(8), 1725-1734.
- Holland, W. L., Bikman, B. T., Wang, L.-P., Yuguang, G., Sargent, K. M., Bulchand, S., . . . Summers, S. A. (2011). Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(5), 1858-1870. doi:10.1172/JCI43378
- Holland, W. L., Brozinick, J. T., Wang, L.-P., Hawkins, E. D., Sargent, K. M., Liu, Y., . . . Siesky, A. (2007). Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell metabolism*, 5(3), 167-179.
- Hotamisligil, G. S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, 140(6), 900-917.
- Hudspeth, A. J., Jessell, T. M., Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Siegelbaum, S. A. (2013). *Principles of neural science*: McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Indicadores por Estado | OMENT. (2017). Retrieved from <http://oment.uanl.mx/indicadores-por-estado/>
- Johnson, A. R., Wilkerson, M. D., Sampey, B. P., Troester, M. A., Hayes, D. N., & Makowski, L. (2016). Cafeteria diet-induced obesity causes oxidative damage in white adipose. *Biochemical and biophysical research communications*, 473(2), 545-550.
- Kasumov, T., Solomon, T. P., Hwang, C., Huang, H., Haus, J. M., Zhang, R., & Kirwan, J. P. (2015). Improved insulin sensitivity after exercise training is linked to reduced plasma C14: 0 ceramide in obesity and type 2 diabetes. *Obesity*, 23(7), 1414-1421.
- Kawasaki, N., Asada, R., Saito, A., Kanemoto, S., & Imaizumi, K. (2012). Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Scientific reports*, 2.
- Kim, J.-a., Wei, Y., & Sowers, J. R. (2008). Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circulation research*, 102(4), 401-414.
- Kirk, S. L., Samuelsson, A.-M., Argenton, M., Dhonye, H., Kalamatianos, T., Poston, L., . . . Coen, C. W. (2009). Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLOS ONE*, 4(6), e5870.
- Kotronen, A., Velagapudi, V., Yetukuri, L., Westerbacka, J., Bergholm, R., Ekroos, K., . . . Yki-Järvinen, H. (2009). Serum saturated fatty acids containing triacylglycerols are better markers of insulin resistance than total serum triacylglycerol concentrations. *Diabetologia*, 52(4), 684.

- Kurek, K., Piotrowska, D. M., Wiesiołek-Kurek, P., Łukaszuk, B., Chabowski, A., Górski, J., & Żendzian-Piotrowska, M. (2014). Inhibition of ceramide de novo synthesis reduces liver lipid accumulation in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver International*, *34*(7), 1074-1083.
- Lalanza, J. F., Caimari, A., del Bas, J. M., Torregrosa, D., Cigarroa, I., Pallàs, M., . . . Escorihuela, R. M. (2014). Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour. *PLOS ONE*, *9*(1), e85049.
- Law, B. A., Liao, X., Moore, K. S., Southard, A., Roddy, P., Ji, R., . . . Cowart, L. A. (2018). Lipotoxic very-long-chain ceramides cause mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and cell death in cardiomyocytes. *The FASEB Journal*, *32*(3), 1403-1416.
- Leal, S., Andrade, J. P., Paula-Barbosa, M. M., & Madeira, M. D. (1998). Arcuate nucleus of the hypothalamus: effects of age and sex. *Journal of comparative neurology*, *401*(1), 65-88.
- Lee, Y., Naseem, R. H., Duplomb, L., Park, B.-H., Garry, D. J., Richardson, J. A., . . . Unger, R. H. (2004). Hyperleptinemia prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA synthase transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(37), 13624-13629.
- Lee, Y., Wang, M.-Y., Kakuma, T., Wang, Z.-W., Babcock, E., McCorkle, K., . . . Unger, R. H. (2001). Liporegulation in Diet-induced Obesity THE Antisteatotic Role Of Hyperleptinemia. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(8), 5629-5635.
- León-Mimila, P., Vega-Badillo, J., Gutiérrez-Vidal, R., Villamil-Ramírez, H., Villareal-Molina, T., Larrieta-Carrasco, E., . . . Méndez-Sánchez, N. (2015). A genetic risk score is associated with hepatic triglyceride content and non-alcoholic steatohepatitis in Mexicans with morbid obesity. *Experimental and molecular pathology*, *98*(2), 178-183.
- Lytton, J., Westlin, M., & Hanley, M. R. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *Journal of biological Chemistry*, *266*(26), 17067-17071.
- Ma, W., Huang, X., Yang, X., & Liang, X. (2016). Maternal obesity in mice not only affects fresh embryo quality but also aggravates injury due to vitrification. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *33*(11), 1515-1523.
- Mayer, C. M., & Belsham, D. D. (2010). Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology*, *151*(2), 576-585.
- McPherson, N. O., Bell, V. G., Zander-Fox, D., Fullston, T., Wu, L. L., Robker, R. L., & Lane, M. (2015). When two obese parents are worse than one! Impacts on embryo and fetal development. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *309*(6), E568-E581.

- Melo, A. M., Benatti, R. O., Ignacio-Souza, L. M., Okino, C., Torsoni, A. S., Milanski, M., . . . Torsoni, M. A. (2014). Hypothalamic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring of mice dams fed high-fat diet during pregnancy and lactation. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 63(5), 682-692.
- Mokrosiński, J., Madsen, A. N., & Holst, B. (2014). Constitutive Activity of the Ghrelin Receptor *Central Functions of the Ghrelin Receptor* (pp. 3-19): Springer.
- Montgomery, M. K., & Turner, N. (2015). Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocrine connections*, 4(1), R1-R15.
- Morton, G. J., Meek, T. H., & Schwartz, M. W. (2014). Neurobiology of food intake in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(6), 367.
- Muñoz, J. P., Ivanova, S., Sánchez-Wandelmer, J., Martínez-Cristóbal, P., Noguera, E., Sancho, A., . . . Mauvezin, C. (2013). Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK. *The EMBO Journal*, 32(17), 2348-2361.
- Naon, D., Zaninello, M., Giacomello, M., Varanita, T., Grespi, F., Lakshminarayanan, S., . . . Hernández-Alvarez, M. I. (2016). Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum–mitochondria tether. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(40), 11249-11254.
- Nathanielsz, P. W., Poston, L., & Taylor, P. D. (2007). In Utero Exposure to Maternal Obesity and Diabetes: Animal Models That Identify and Characterize Implications for Future Health. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 34(2), 201-212. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ogc.2007.03.006>
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*: Macmillan.
- Nguyen, L. T., Saad, S., Tan, Y., Pollock, C., & Chen, H. (2017). Maternal high-fat diet induces metabolic stress response disorders in offspring hypothalamus. *Journal of Molecular Endocrinology*, 59(1), 81-92. doi:10.1530/jme-17-0056
- Nie, Q., Wang, C., Song, G., Ma, H., Kong, D., Zhang, X., . . . Tang, Y. (2014). Mitofusin 2 deficiency leads to oxidative stress that contributes to insulin resistance in rat skeletal muscle cells. *Molecular biology reports*, 41(10), 6975-6983.
- Palacios Hernández, B., Alanis, B. T., & de la Cruz, M. (2017). The importance of mental health care in a disaster situation Experience of the psychological emergency support brigades from universities after the earthquake of September 19 of 2017 in Mexico. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 49(4), 513-516.
- Pennanen, C., Parra, V., López-Crisosto, C., Morales, P. E., del Campo, A., Gutierrez, T., . . . Zorzano, A. (2014). Mitochondrial fission is required for cardiomyocyte hypertrophy mediated by a Ca²⁺-calcineurin signaling pathway. *J Cell Sci*, 127(12), 2659-2671.
- Pewzner-Jung, Y., Park, H., Laviad, E. L., Silva, L. C., Lahiri, S., Stiban, J., . . . Wieland, F. (2010). A Critical Role for Ceramide Synthase 2 in Liver

- Homeostasis I. ALTERATIONS IN LIPID METABOLIC PATHWAYS. *Journal of Biological Chemistry*, 285(14), 10902-10910.
- Pileggi, C. A., Hedges, C. P., Segovia, S. A., Markworth, J. F., Durainayagam, B. R., Gray, C., . . . Cameron-Smith, D. (2016). Maternal High Fat Diet Alters Skeletal Muscle Mitochondrial Catalytic Activity in Adult Male Rat Offspring. *Frontiers in Physiology*, 7, 546. doi:10.3389/fphys.2016.00546
- Pomar, C., van Nes, R., Sánchez, J., Picó, C., Keijer, J., & Palou, A. (2017). Maternal consumption of a cafeteria diet during lactation in rats leads the offspring to a thin-outside-fat-inside phenotype. *International Journal of Obesity*, 41(8), 1279.
- Popkin, B. M., & Gordon-Larsen, P. (2004). The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 28(S3), S2-S9.
- Porte, D., & Kahn, S. E. (2001). beta-cell dysfunction and failure in type 2 diabetes: potential mechanisms. *Diabetes*, 50(suppl 1), S160.
- Prats, E., Monfar, M., Castella, J., Iglesias, R., & Alemany, M. (1989). Energy intake of rats fed a cafeteria diet. *Physiology & behavior*, 45(2), 263-272.
- Prieur, X., Mok, C. Y., Velagapudi, V. R., Núñez, V., Fuentes, L., Montaner, D., . . . O'Rahilly, S. (2011). Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes*, 60(3), 797-809.
- Raichur, S., Wang, S. T., Chan, P. W., Li, Y., Ching, J., Chaurasia, B., . . . Sugii, S. (2014). CerS2 haploinsufficiency inhibits β -oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance. *Cell metabolism*, 20(4), 687-695.
- Realí, F., Morine, M. J., Kahramanoğulları, O., Raichur, S., Schneider, H.-C., Crowther, D., & Priami, C. (2017). Mechanistic interplay between ceramide and insulin resistance. *Scientific reports*, 7, 41231. doi:10.1038/srep41231
[https://www.nature.com/articles/srep41231 - supplementary-information](https://www.nature.com/articles/srep41231-supplementary-information)
- Reginato, A., de Fante, T., Portovedo, M., da Costa, N. F., Payolla, T. B., Miyamoto, J. É., . . . Torsoni, A. S. (2016). Autophagy proteins are modulated in the liver and hypothalamus of the offspring of mice with diet-induced obesity. *The Journal of nutritional biochemistry*, 34, 30-41.
- Ribaroff, G., Wastnedge, E., Drake, A., Sharpe, R., & Chambers, T. (2017). Animal models of maternal high fat diet exposure and effects on metabolism in offspring: a meta-regression analysis. *Obesity Reviews*, 18(6), 673-686.
- Rico, J. E., Bandaru, V. V. R., Dorskind, J. M., Haughey, N. J., & McFadden, J. W. (2015). Plasma ceramides are elevated in overweight Holstein dairy cows experiencing greater lipolysis and insulin resistance during the transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 7757-7770. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2015-9519>
- Robbins, A. L., & Savage, D. B. (2015). The genetics of lipid storage and human lipodystrophies. *Trends in molecular medicine*, 21(7), 433-438.
- Rowland, A. A., & Voeltz, G. K. (2012). Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(10), 607-625.

- Saben, J. L., Boudoures, A. L., Asghar, Z., Thompson, A., Drury, A., Zhang, W., . . . Moley, K. H. (2016). Maternal metabolic syndrome programs mitochondrial dysfunction via germline changes across three generations. *Cell reports*, *16*(1), 1-8.
- Samad, F., Badeanlou, L., Shah, C., & Yang, G. (2011). Adipose Tissue and Ceramide Biosynthesis in the Pathogenesis of Obesity. In L. A. Cowart (Ed.), *Sphingolipids and Metabolic Disease* (pp. 67-86). New York, NY: Springer New York.
- Santoro, A., Campolo, M., Liu, C., Sesaki, H., Meli, R., Liu, Z.-W., . . . Diano, S. (2017). DRP1 suppresses leptin and glucose sensing of POMC neurons. *Cell metabolism*, *25*(3), 647-660.
- Schneeberger, M., Dietrich, M. O., Sebastián, D., Imbernón, M., Castaño, C., García, A., . . . Bortolozzi, A. (2013). Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell*, *155*(1), 172-187.
- Sebastián, D., Hernández-Alvarez, M. I., Segalés, J., Sorianello, E., Muñoz, J. P., Sala, D., . . . Gopalacharyulu, P. (2012). Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(14), 5523-5528.
- Shah, C., Yang, G., Lee, I., Bielawski, J., Hannun, Y. A., & Samad, F. (2008). Protection from high fat diet-induced increase in ceramide in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(20), 13538-13548.
- Sheikh, A. Q., Hurley, J. R., Huang, W., Taghian, T., Kogan, A., Cho, H., . . . Narmoneva, D. A. (2012). Diabetes alters intracellular calcium transients in cardiac endothelial cells. *PloS one*, *7*(5), e36840.
- Shulman, G. I. (2014). Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *New England Journal of Medicine*, *371*(12), 1131-1141.
- Smyth, I., Hacking, D. F., Hilton, A. A., Mukhamedova, N., Meikle, P. J., Ellis, S., . . . Bahlo, M. (2008). A mouse model of harlequin ichthyosis delineates a key role for Abca12 in lipid homeostasis. *PLoS genetics*, *4*(9), e1000192.
- Srinivasan, S., Guha, M., Kashina, A., & Avadhani, N. G. (2017). Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1858*(8), 602-614. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.01.004>
- Stark, R., & Andrews, Z. B. (2014). The role of the ghrelin receptor in appetite and energy metabolism *Central Functions of the Ghrelin Receptor* (pp. 35-52): Springer.
- Suárez-García, S., del Bas, J. M., Caimari, A., Escorihuela, R. M., Arola, L., & Suárez, M. (2017). Impact of a cafeteria diet and daily physical training on the rat serum metabolome. *PLOS ONE*, *12*(2), e0171970.
- Sullivan, E. L., Rivera, H. M., True, C. A., Franco, J. G., Baquero, K., Dean, T. A., . . . Hanna, G. (2017). Maternal and postnatal high-fat diet consumption programs energy balance and hypothalamic melanocortin signaling in

- nonhuman primate offspring. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 313(2), R169-R179.
- Szendroedi, J., Frossard, M., Klein, N., Bieglmayer, C., Wagner, O., Pacini, G., . . . Roden, M. (2012). Lipid-induced insulin resistance is not mediated by impaired transcapillary transport of insulin and glucose in humans. *Diabetes*, 61(12), 3176-3180.
- T., T. K., CF, C. A., J., C. M., Rima, C., Amin, X., Johann, G. B., . . . Dorit, S. B. (2016). Skeletal muscle and plasma lipidomic signatures of insulin resistance and overweight/obesity in humans. *Obesity*, 24(4), 908-916. doi:doi:10.1002/oby.21448
- Ter Horst, K. W., Gilijamse, P. W., Versteeg, R. I., Ackermans, M. T., Nederveen, A. J., la Fleur, S. E., . . . Samuel, V. T. (2017). Hepatic diacylglycerol-associated protein kinase C ϵ translocation links hepatic steatosis to hepatic insulin resistance in humans. *Cell reports*, 19(10), 1997-2004.
- Turpin, S. M., Nicholls, H. T., Willmes, D. M., Mourier, A., Brodesser, S., Wunderlich, C. M., . . . Brönneke, H. S. (2014). Obesity-induced CerS6-dependent C 16: 0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell metabolism*, 20(4), 678-686.
- Unger, R. H., & Scherer, P. E. (2010). Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(6), 345-352.
- Ussher, J. R., Koves, T. R., Cadete, V. J., Zhang, L., Jaswal, J. S., Swyrd, S. J., . . . Muoio, D. M. (2010). Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes*, 59(10), 2453-2464.
- Vaiserman, A. (2011). Early-life origin of adult disease: Evidence from natural experiments. *Experimental Gerontology*, 46(2), 189-192. doi:<https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.08.031>
- Varela, L., & Horvath, T. L. (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO reports*, 13(12), 1079-1086.
- Wai, T., & Langer, T. (2016). Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(2), 105-117.
- Wankhade, U. D., Chintapalli, S., Zhong, Y., Kang, P., & Shankar, K. (2016). Maternal Obesity Programs Offspring's Predisposition to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Steatohepatitis. *The FASEB Journal*, 30(1 Supplement), 516.517-516.517.
- Watson, M. L., Coghlan, M., & Hundal, H. S. (2009). Modulating serine palmitoyl transferase (SPT) expression and activity unveils a crucial role in lipid-induced insulin resistance in rat skeletal muscle cells. *Biochemical Journal*, 417(3), 791-801.
- White, C. L., Purpera, M. N., & Morrison, C. D. (2009). Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(5), R1464-R1472.
- Wigger, L., Cruciani-Guglielmacci, C., Nicolas, A., Denom, J., Fernandez, N., Fumeron, F., . . . Thorens, B. (2017). Plasma Dihydroceramides Are

- Diabetes Susceptibility Biomarker Candidates in Mice and Humans. *Cell reports*, 18(9), 2269-2279. doi:<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.019>
- Williams, E. P., Mesidor, M., Winters, K., Dubbert, P. M., & Wyatt, S. B. (2015). Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Current Obesity Reports*, 4(3), 363-370. doi:10.1007/s13679-015-0169-4
- Wu, L. L., Russell, D. L., Wong, S. L., Chen, M., Tsai, T.-S., St John, J. C., . . . Robker, R. L. (2015). Mitochondrial dysfunction in oocytes of obese mothers: transmission to offspring and reversal by pharmacological endoplasmic reticulum stress inhibitors. *Development*, 142(4), 681-691.
- Wu, Z., Zhao, J., Xu, H., Lyv, Y., Feng, X., Fang, Y., & Xu, Y. (2014). Maternal quercetin administration during gestation and lactation decrease endoplasmic reticulum stress and related inflammation in the adult offspring of obese female rats. *European journal of nutrition*, 53(8), 1669-1683.
- Youle, R. J., & Van Der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337(6098), 1062-1065.
- Young, J., & Polston, E. (2013). Specialized features of the arcuate nucleus of the hypothalamus. *The human hypothalamus: anatomy, functions and disorders*. Nova Science Publishers, New York, 31-66.
- Zambrano, E., Sosa-Larios, T., Calzada, L., Ibáñez, C. A., Mendoza-Rodríguez, C. A., Morales, A., & Morimoto, S. (2016). Decreased basal insulin secretion from pancreatic islets of pups in a rat model of maternal obesity. *Journal of Endocrinology*, 231(1), 49-57.
- Zhang, Z., Wakabayashi, N., Wakabayashi, J., Tamura, Y., Song, W.-J., Sereda, S., . . . Pletnikov, M. V. (2011). The dynamin-related GTPase Opa1 is required for glucose-stimulated ATP production in pancreatic beta cells. *Molecular biology of the cell*, 22(13), 2235-2245.
- Zorzano, A., Hernández-Alvarez, M. I., Sebastián, D., & Muñoz, J. P. (2015). Mitofusin 2 as a driver that controls energy metabolism and insulin signaling. *Antioxidants & redox signaling*, 22(12), 1020-1031.
- Zorzano, A., Liesa, M., & Palacin, M. (2009). Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(10), 1846-1854.

Anexos

Preparación de dieta de Cafetería

Ingredientes

1. 100 g Alimento para roedor molido
2. 100 g Galletas María molidas
3. 100 g Papas fritas molidas

4. 100 g Chocolate líquido
5. 100 g Tocino ahumado
6. 200 g Paté de hígado de cerdo

Mezclar bien todos los ingredientes para formar una masa uniforme. Dividir en bolitas de 50 g

Preparación de dieta HSD

Ingredientes

1. 100 g Alimento para roedor molido
2. 150 g Leche condensada

Mezclar bien todos los ingredientes. Se formara una mezcla viscosa que hay que dividir en forma de galletas de 50 g sobre un papel aluminio.

Preparación de Geles de poliacrilamida

Resolving 8% (10 ml)

1. 4.7 ml de agua destilada
2. 2.7 ml de bis-acrilamida al 30%
3. 2.5 ml Buffer 1.5M TRIS pH 8.8
4. 100 µl SDS 10%

Agregar 50 µl de PSA al 10% + 5 µl de TEMED para polimerizar

Stacking 4% (10 ml)

1. 6.1 ml de agua destilada
2. 1.3 ml de bis-acrilamida al 30%
3. 2.5 ml de Buffer 0.5M TRIS pH 6.8
4. 100 µl SDS 10%

Agregar 50 µl de PSA al 10% + 10 µl de TEMED para polimerizar

Soluciones

Buffer de corrida 10X (1L)

1. 30.3 g de Tris base
2. 144.13 g de glicina
3. 10.0g de SDS

Completar con agua destilada a 1 L

Buffer de corrida 1X (1L)

1. • Tomar 100mL del buffer 10x de corrida 10X

2. • Agregar 900mL de agua destilada
25mM Tris-Hcl, 192mM glicina, 0.1% SDS

Buffer de transferencia 10 X (1L)

1. • 30.3 g de TRIS HCL
2. • 144.13 g de Glicina
3. • 1 g de SDS

Completar 1 L de Agua destilada

Buffer de transferencia 1X

1. • Tomar 100mL del buffer de transferencia 10X
2. • Agregar 200mL de Metanol
3. • Completar con Agua destilada a 1L (700mL)

25mM TRIS-Hcl, 192mM glicina, 20% metanol, 0.01% SDS

Buffer de lisis

Para 10mL

1. • 0.25 mL de 1M TRIS-HCl
2. • 1.5mL de 1M NaCl • 0.1mL de Triton X-100
3. • 0.104mL de SDS 10%
4. • 1 Tableta de PhosSTOP de Roche
5. • 1 Tableta de cOplete, Mini, EDTA-free de Roche

Notas: 25mM TRIS-HCl, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS. Por cada 10 mL es una tableta de PhosSTOP y una de cOplete, estos deben de tener los siguientes números de REF 04 906 845 001 y 04 693 159 001. Revisar en la página de Roche para más detalles.

RESEARCH

Open Access



Maternal overnutrition by hypercaloric diets programs hypothalamic mitochondrial fusion and metabolic dysfunction in rat male offspring

Robbi E. Cardenas-Perez^{1,2}, Lizeth Fuentes-Mera¹, Ana Laura de la Garza³, Ivan Torre-Villalvazo⁴, Luis A. Reyes-Castro⁵, Humberto Rodriguez-Rocha⁶, Aracely Garcia-Garcia⁶, Juan Carlos Corona-Castillo⁷, Armando R. Tovar⁴, Elena Zambrano⁵, Rocio Ortiz-Lopez⁸, Jennifer Saville⁹, Maria Fuller⁹ and Alberto Camacho^{1,2,10*} 

Abstract

Background: Maternal overnutrition including pre-pregnancy, pregnancy and lactation promotes a lipotoxic insult leading to metabolic dysfunction in offspring. Diet-induced obesity models (DIO) show that changes in hypothalamic mitochondria fusion and fission dynamics modulate metabolic dysfunction. Using three selective diet formula including a High fat diet (HFD), Cafeteria (CAF) and High Sugar Diet (HSD), we hypothesized that maternal diets exposure program leads to selective changes in hypothalamic mitochondria fusion and fission dynamics in male offspring leading to metabolic dysfunction which is exacerbated by a second exposure after weaning.

Methods: We exposed female Wistar rats to nutritional programming including Chow, HFD, CAF, or HSD for 9 weeks (pre-mating, mating, pregnancy and lactation) or to the same diets to offspring after weaning. We determined body weight, food intake and metabolic parameters in the offspring from 21 to 60 days old. Hypothalamus was dissected at 60 days old to determine mitochondria-ER interaction markers by mRNA expression and western blot and morphology by transmission electron microscopy (TEM). Mitochondrial-ER function was analyzed by confocal microscopy using hypothalamic cell line mHypoA-CLU192.

Results: Maternal programming by HFD and CAF leads to failure in glucose, leptin and insulin sensitivity and fat accumulation. Additionally, HFD and CAF programming promote mitochondrial fusion by increasing the expression of MFN2 and decreasing DRP1, respectively. Further, TEM analysis confirms that CAF exposure after programming leads to an increase in mitochondria fusion and enhanced mitochondrial-ER interaction, which partially correlates with metabolic dysfunction and fat accumulation in the HFD and CAF groups. Finally, we identified that lipotoxic palmitic acid stimulus in hypothalamic cells increases Ca²⁺ overload into mitochondria matrix leading to mitochondrial dysfunction.

Conclusions: We concluded that maternal programming by HFD induces hypothalamic mitochondria fusion, metabolic dysfunction and fat accumulation in male offspring, which is exacerbated by HFD or CAF exposure after weaning, potentially due to mitochondria calcium overflux.

Keywords: Maternal overnutrition, Diet induced obesity (DIO), Hypothalamus, Mitochondria, Mitochondria dynamics, Fusion, Fission

* Correspondence: acm590@hotmail.com; alberto.camachomr@uanl.edu.mx

¹Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico

²Unidad de Neurometabolismo, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Maternal obesity in humans associates with an increased risk of obesity metabolic-related disorders in offspring [1, 2]. It is known that obesity and maternal overnutrition create changes in uterine milieu during pregnancy leading to developmental alterations and defects in organ function and metabolism in offspring [3, 4]. Also, maternal nutritional programming by hypercaloric diets exposure that simulate Western diets, such as high fat diet (HFD), cafeteria diet (CAF) or high sugar diet (HSD) in murine models, change offspring metabolism leading to insulin resistance, type 2 diabetes mellitus (T2DM) [5–7], cardiovascular diseases and hypertension [8], non-alcoholic liver diseases and steatohepatitis [9, 10]. Defective molecular pathways related to maternal programming by nutrient oversupply can lead to failure in mitochondria dynamics including modifications in mitochondria fission and fusion, which are potentially linked to metabolic compromise and disease susceptibility [11].

Diet-induced obesity murine models alter mitochondrial function and dynamics in selective organs including muscles, adipose tissue, liver and brain [11]. In particular, maternal obesity in rodents is associated with altered mitochondria function, reactive oxygen species generation and an increased mtDNA and mitochondrial biogenesis in oocytes and zygotes [12]. Likewise, oocytes and blastocysts from obese mice show reduced mitochondrial membrane potential, high levels of autophagy and reduced mtDNA and mitochondrial biogenesis [13, 14], potentially linked to hepatic lipotoxic insult in fetuses of obese females [13]. In fact, mitochondrial function in offspring after maternal programming seems to be sex-dependent, showing insulin resistant and oxidative stress in males in compare with females [15, 16]. Finally, in humans, placentas of obese mothers show a decrease in mtDNA and mitochondrial dysfunction which correlate with metabolic dysfunction in offspring [17].

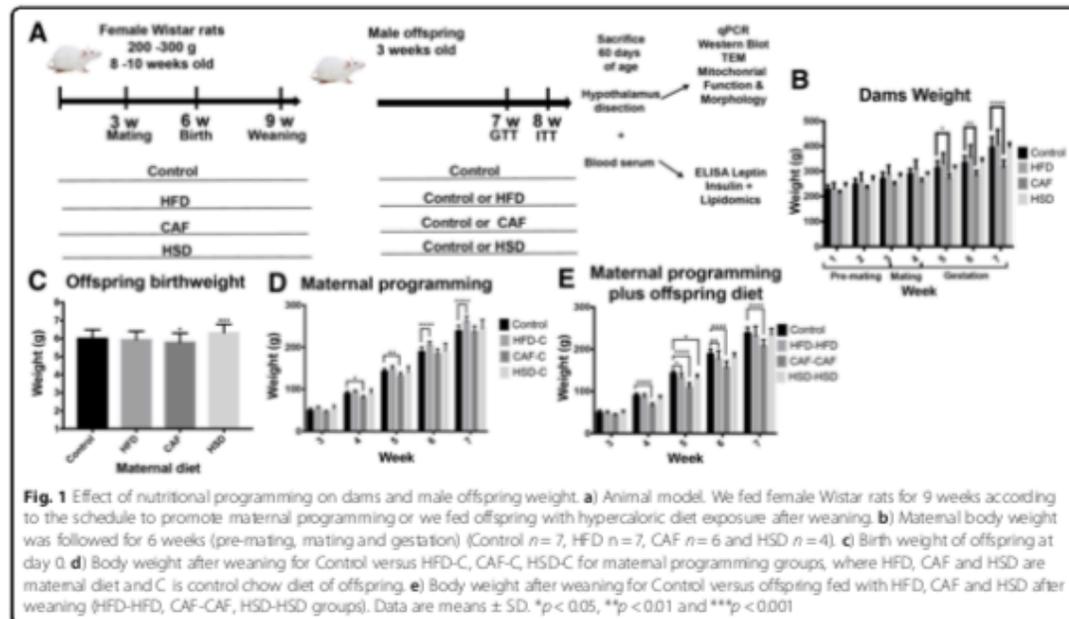
Mitochondrial functions are modulated by fission and fusion dynamic processes which assist to maintaining mitochondria homeostasis [18]. Mitofusin 1 and 2 (MFN 1 and 2) and OPA1 and DRP1 modulate fusion and fission processes, respectively, helping to reduce cellular stress by joining mitochondria or creating new mitochondria to assist deficient mitochondria [18]. Maternal programming by HFD exposure in rodent dams, decrease expression of OPA1 and DRP1 proteins in skeletal muscles of female offspring and disrupt mitochondrial function in male offspring [19, 20], which might be transmitted across three generations [20]. Furthermore, we and others have reported that obese mice showed changes in MFN2 expression in hypothalamus and other tissues [21–24], and importantly mitochondria elongate in a *Mfn1/2* dependent manner in Agouti-related peptide neurons [25]. Here, we hypothesized that maternal nutritional programming before and after

weaning by selective diets might modulate mitochondria fusion and fission dynamics in male offspring leading to metabolic dysfunction.

Methods

Animals, diets and nutritional programming model in offspring by HFD, CAF and HSD exposure

All the experiments were first performed using 8–10 weeks-old female Wistar rats, 200–250 g ($n = 24$). Animals were handled according to the NIH guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 80–23, revised in 1996), with approval of the local Animal Care Committee (BI0002). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. Rats were housed individually in Plexiglas style cages, maintained at 22–23 °C and 12-h light/dark cycle. Water and food was available ad libitum. Animals were acclimated to the animal facility 7 days prior to diets exposure. Female rats were randomized into four dietary groups: Control diet, HFD diet, CAF diet and HSD diet (Table 1). The formulation of diets was: Control that contained a caloric density of 3.35 kcal/g divided in 71% carbohydrates, 11% lipids and 18% proteins (Research Diets, New Brunswick, NJ, Cat. D12450B). High-fat diet (HFD) contained a caloric density of 4.9 Kcal/g divided in 45% lipids, 20% proteins and, 35% carbohydrates. Cafeteria (CAF) diet was made of liquid chocolate, biscuits, bacon, fries potatoes, standard diet and pork pate based on a 1:1:1:1:1:2 ratio, respectively; total calories 3.72 kcal/g in 39% carbohydrates, 49% lipids, 12% proteins and 513.53 mg of Sodium. High sugar diet (HSD) composition was Standard diet and condensed milk on a 1:1.5 ratio, respectively; total calories 3.39 kcal/g in 69% carbohydrates, 18.5% lipids, 12.5% proteins and 228 mg of Sodium. It is important to point out that these diets appear to be found in human population. After randomization, female rats were fed for 9 weeks, including 3 weeks of pre-mating, mating, birth, and lactation. Rats were mated with 12–14 weeks old Wistar males, 300–350 g, during two days. Also, it is important to highlight that body weight was quantified in these females every week during pre-mating and gestation (See Fig. 1a). We registered body weight of all offspring at birth (approximately 15 rats/litter) and at the age of 3 weeks we euthanized female offspring. Male offspring was grouped into 10–12 subjects per group and were allocated into two groups: Group 1) exposure to Chow control diet to analyze maternal programming, including three groups: Maternal HFD and offspring Chow control diet (HFD-C), Maternal CAF diet and offspring Chow control diet (CAF-C) and Maternal HSD and offspring Chow control diet (HSD-C); Group 2) exposure to the same diet of their mothers until the age of 8 weeks, resulting in three groups: Maternal HFD and offspring



HFD (HFD-HFD), Maternal CAF diet and offspring CAF diet (CAF-CAF) and Maternal HSD and offspring HSD (HSD-HSD). We compared these groups with a group where females and their offspring were fed with Chow Control diet. A total of seven experimental groups were included: Control, HFD-C, CAF-C, HSD-C, and HFD-HFD, CAF-CAF and HSD-HSD. Body weight, food and calorie intake were quantified in offspring from 3rd-7th week following by metabolic assessments as described below (see Fig. 1a for details). The daily calorie intake was calculated from the weight of food consumed multiplied by the calories/gram of the food.

Glucose tolerance and insulin tolerance test (GTT, ITT) assessments

To test if maternal programming by selective hypercaloric diets leads to alterations in the tolerance of glucose and insulin, the GTT and ITT tests were carried out in the offspring. Males were 8 h–12 h fasted and then were intraperitoneally injected with 40% glucose body weight or 1 U of insulin/100 g body weight. Blood glucose levels were quantified at 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, and 120 min, as described previously [26]. These tests were performed at the age of 7 weeks for GTT and 8 weeks for ITT in each male rat.

Table 1 Diet Composition

| Diet | Percentage of macronutrients | Ingredients |
|---------|--|--|
| Control | Carbohydrates 71% Lipids 11% Proteins 18% Caloric density 3.35 kcal/g | Cystine 0.14 g, Coline 0.19 g, Vitamins 1.89 g, Cellulose 2.89 g, Minerals 4.73 g, Soybean oil 5.16 g, Starch 32.59 g, Dextrin 16.60 g, Sucrose 16 g, Casein 19.87 g per 100 g |
| HFD | Carbohydrates 35% Lipids 49% Proteins 20% Caloric density 4.9 kcal/g | Cystine 0.17 g, Coline 0.23 g, Vitamins 2.99 g, Cellulose 1.72 g, Minerals 5.57 g, Inulin 1.72, Soybean oil 5.75 g, Dextrin 29.46 g, Sucrose 10.35 g, Casein 24.14 g, Lard 17.72 g per 100 g |
| CAF | Carbohydrates 39% Lipids 49% Proteins 12% Caloric density 3.72 kcal/g | Chow diet 14.29 g, liquid chocolate 14.29 g, biscuits 14.29 g, bacon 14.29 g, fries potatoes 14.29 g, pork pate 28.58 g 1:1:1:1:1:2 ratio per 100 g |
| HSD | Carbohydrates 69% Lipids 18.5% Proteins 12.5% Caloric density 3.39 kcal/g | Chow diet 40 g, condensed milk 60 g 1:1.5 ratio per 100 g |

Tissue samples collection

Male rats were sacrificed by decapitation at 9 weeks of age. Blood samples were collected in 500 μ L tubes (Beckton Dickinson) and plasma fraction was isolated by centrifugation at 4 °C and frozen at -80 °C. Hypothalamus was dissected and divided into the left hemisphere (for RNA extraction and gene expression analysis) and right hemisphere (frozen immediately at 80 °C for western blot analysis). Also, liver and retroperitoneal white adipose tissue was measured and collected.

Plasma biochemistry determination

Glucose was determined by glucose strips and Accu-check[®] (Roche, Cat. 05987270), insulin (Millipore Inc., Cat. EZRMI-13 k) and leptin (Millipore Inc., Cat. EZML-82 K) were determined by Elisa kits according to manufacturers' instructions.

Mass spectrometric determinations of triglycerides

Triglycerides were extracted from 10 μ L of plasma using a single phase extraction method as described in Fuller et al. (2015), with the exception that 100 pmol of glyceryl triheptadecanoate (TG (17:0/17:0/17:0); Sigma-Aldrich, Cat. T2151) was added to each sample as the internal standard. Extracted triglycerides were first separated on a RRHD Eclipse Plus C18 column (2.1 \times 150 mm; 1.8 μ m) maintained at 40 °C. The samples were maintained at 16 °C with 3 μ L injected into the mobile phase which was at a flow rate of 0.4 mL/min. Mobile phase A consisted of 60% H₂O, 40% CH₃CN containing 10 mM NH₄COOH and solvent B was 90% (CH₃)₂CHOH, 10% CH₃CN containing 10 mM NH₄COOH. Mobile phase conditions were 90% solvent A and 10% solvent B at injection, which was linearly ramped to 50% by 6 min and then to 100% solvent B at 24 min. This was maintained for 3 min before returning to 90% solvent A at 28 min, where the column equilibrated for 4 min prior to the next injection.

For the first 4 min column flow was diverted to waste before being directed into the electrospray source (ES 5500 V) of an AB SCIEX QTRAP 6500 triple quadrupole tandem mass spectrometer with an ion source temperature of 250 °C. Nitrogen was used for curtain gas, 25 units; collision gas set at medium; nebulizer gas 1, 20 units and auxiliary gas 2, 40 units. Declustering potential was 120 V; entrance potential, 8 V, collision energy, 36 V and collision exit potential, 26 V. Individual species of triglycerides were measured by multiple reaction monitoring in positive ion mode using the ammonium adduct and corresponding fragment arising from the neutral loss of one fatty acid. As such, only the sum composition (i.e. total number of carbons and double bonds) of the remaining two remaining fatty acyl chains could be determined. Sixty three transitions were monitored with 57 species detected in plasma. Fatty acyl chain lengths ranged from 14:0 to 22:6 and of

particular interest were the following transitions: 16:0/36:4 (872.8/599.6), 18:0/34:1 (878.8/577.5), 18:2/36:2 (900.9/603.6) and 18:0/36:2 (904.9/603.6). Six species were present at high concentrations, requiring quantification from the [M + 1] isotopologue due to saturation of the detector by the mono-isotopic ion. These were 16:1/34:2 (847.8/576.6), 18:1/32:1 (849.8/550.5), 18:1/32:0 (851.8/552.6), 18:2/34:1 (875.8/578.6), 16:0/36:2 (877.8/604.6) and 18:1/36:2 (903.9/604.6). The concentration of each species was calculated using MultiQuant 3.0.1 software (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) by relating the peak area of each species to that of the internal standard.

Western blot analysis

Frozen hypothalamus was homogenized in 500 μ L lysis buffer as described previously with minor modifications [27]. Samples were subjected to SDS-PAGE, nitrocellulose membranes blocked for 2 h at RT in TBS-T buffer (10 mM Tris, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) containing 5% BSA (Santa Cruz Biotechnology, Inc., cat. sc2323) and incubated overnight with primary antibodies at 4 °C in TBS-T Buffer 1% BSA: anti-MFN2 (Abcam, Product code ab56889, 1:1000), anti-Drp1 (Cell Signaling, Cat. 8570, Dilution 1:2000) and B-actin (Cell Signaling, Cat. 8457, Dilution 1:3000). Anti-mouse and anti-rabbit horseradish Peroxidase-conjugated were used as secondary antibody in TBS-Buffer 5% BSA (Cell Signaling, Cat. 7076S & Cat. 7074P29, Dilution 1:3000). Proteins were detected by chemiluminescence in the Chemidoc XRS+ System (BioRad) using Clarity Western ECL Blotting Substrates (BioRad, Cat. No. 1705061). Images were quantified densitometrically with ImageJ Software 1.50i (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

RNA isolation and real time (RT)-PCR

RNA extraction from hypothalamic samples was performed as described previously [28]. RT-PCR was performed by High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems, Cat. 4,368,814) using random primers and following standardized protocols.

Quantitative PCR

Based on that, obesity modulates ER stress and mitochondria fusion and fission dynamics markers in animal models, we identified changes in mRNA of these markers in the offspring exposed to maternal programming. We performed a quantitative PCR using cDNA (10 ng), Light Cycler SBYR green 480 Master Mix (Roche LifeScience, Product No. 04707516001) and the following primers: MFN2 Forward (5'-CCATGTGTGCTTATCCTTCT-3'), Reverse (5'-TGA CTCCAGCCATGTCCAT-3'); Itp1 Forward (5'-CACCTA TGACCACACTGTCTC-3'), Reverse (5'-AAGAACFCCA TGAGAGTGAC-3'); Hspa5 Forward (5'-CCAGTCAGA TCAAATGTACCCA-3'), Reverse (5'-ATCAGCCCACCG

TAACAATC-3'); Tfam Forward (5'-GTACACCTTCCACT CAGCTTT-3') Reverse (5AGCTAAACACCCAGATGCA A-3'); Drp1 Forward (5'-AACCTTCCCATCAATACA TCC-3') Reverse (5'-TCCAGAGAGGTAGATCCAGAT G-3') and GAPDH like endogenous gen Forward (5'-G TAACCAGGCGTCCGATAC-3'), Reverse (5'-TCTCTGC TCCTCCCTGTTTC-3') (Integrated DNA Technologies, Inc.) in LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche LifeScience, Product No. 05015278001).

Transmission electron microscopy

To elucidate changes in mitochondrial and ER morphology in the hypothalamus linked to hypercaloric diets exposure, a TEM study was performed. Tissue samples of hypothalamus of CAF-CAF and Control groups ($n = 4$) were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.4) for 2 h at room temperature, post-fixed with 1% OsO₄ in 0.1 M sodium cacodylate, and counterstained in 1% uranyl nitrate. Tissue samples were dehydrated through a graduated acetone series and embedded in Epon 812 resin for sectioning. Ultrastructural images of thin sections were observed under a transmission electron microscope Carl-Zeiss EM 109, and collected with a bottom-mount film-based camera.

Measurements of mitochondrial mass, membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and ER activity

Obesity favours a lipotoxic environment with palmitic acid being one of the lipids related to this response and known to increase ER stress and mitochondrial dysfunction. To evaluate the effects of lipotoxicity on the mitochondria of the hypothalamus, we used an *in vitro* model of hypothalamic cells. Hypothalamic mHypA-CLU192 cells were grown on 22 mm coverslips in growth medium (1× DMEM with 10% fetal bovine serum, FBS), 25 mM glucose and 1% penicillin/streptomycin) and maintained at 37 °C with 5% CO₂ for 24 h. Cells were pre-treated with indicated treatments and then cells were loaded with recording medium (RM) consisting of; 156 mM NaCl; 3 mM KCl; 2 mM MgSO₄; 1.25 mM KH₂PO₄; 10 mM D-Glucose; 2 mM CaCl₂; 10 mM Hepes; with pH 7.3–7.4, containing 25 nM TMRM (Tetramethylrhodamine, Molecular Probes, Invitrogen Cat. T668) for $\Delta\Psi_m$ and 1 μ M ER-Tracker Green (Molecular Probes, Invitrogen, Cat. E34251) for 30 min at room temperature (RT) and were washed with saline solution containing 25 nM TMRM. Images were acquired using a Zeiss Axiovert 100 M confocal microscope with a Plan-Neofluar ×63/1.25 oil immersion objective lens at RT. TMRM fluorescence was excited at 543 nm and ER-Tracker Green excited at 488 nm wavelength laser. Images were analysed using the software Image J. For each plane of the z-stack, the two channels ER-Tracker Green and TMRM were separated, following the subtraction of the background fluorescence

(i.e. threshold), to acquire two separate binary images. The proportion of the cytoplasm (stained with ER-Tracker Green) occupied by the mitochondrial network (stained with TMRM) was then calculated from the area of both images, calculating mitochondrial volume fraction occupancy of the cytosol. Images were analysed using the software program Image J.

Mitochondrial Ca²⁺ levels

We assessed if lipotoxicity induced by palmitic acid promotes failure in mitochondrial calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction linked to calcium-overload. Cells were grown on 22 mm coverslips and pre-treated with indicated treatments and then were loaded with RM consisting of: 156 mM NaCl; 3 mM KCl; 2 mM MgSO₄; 1.25 mM KH₂PO₄; 10 mM D-Glucose; 2 mM CaCl₂; 10 mM Hepes; with pH 7.3–7.4, containing 20 μ M Rhod-2 (Molecular Probes, Invitrogen, Cat. R1245), AM and 0.02% Pluronic F-127 for 30 min at RT. The fluorescence intensity was determined every 15 s. Images were obtained using a Zeiss Axiovert 100 M confocal microscope with a Plan-Neofluar ×63/1.25 oil immersion objective lens and equipped with a helium-neon laser at RT. Fluorescence images labelled with Rhod-2 AM were collected using an excitation wavelength of 514 nm. Rhod-2, AM fluorescence was normalized and plotted using the software Image J.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism Software (Version 7.0a Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA). Data were expressed as Mean ± SD. The data presented were analyzed using Two-way analysis of variance (Two-way ANOVA), analysis of variance (ANOVA) or Student's t-test with post-hoc test of Dunnett's multiple comparison test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ were considered significant.

Results

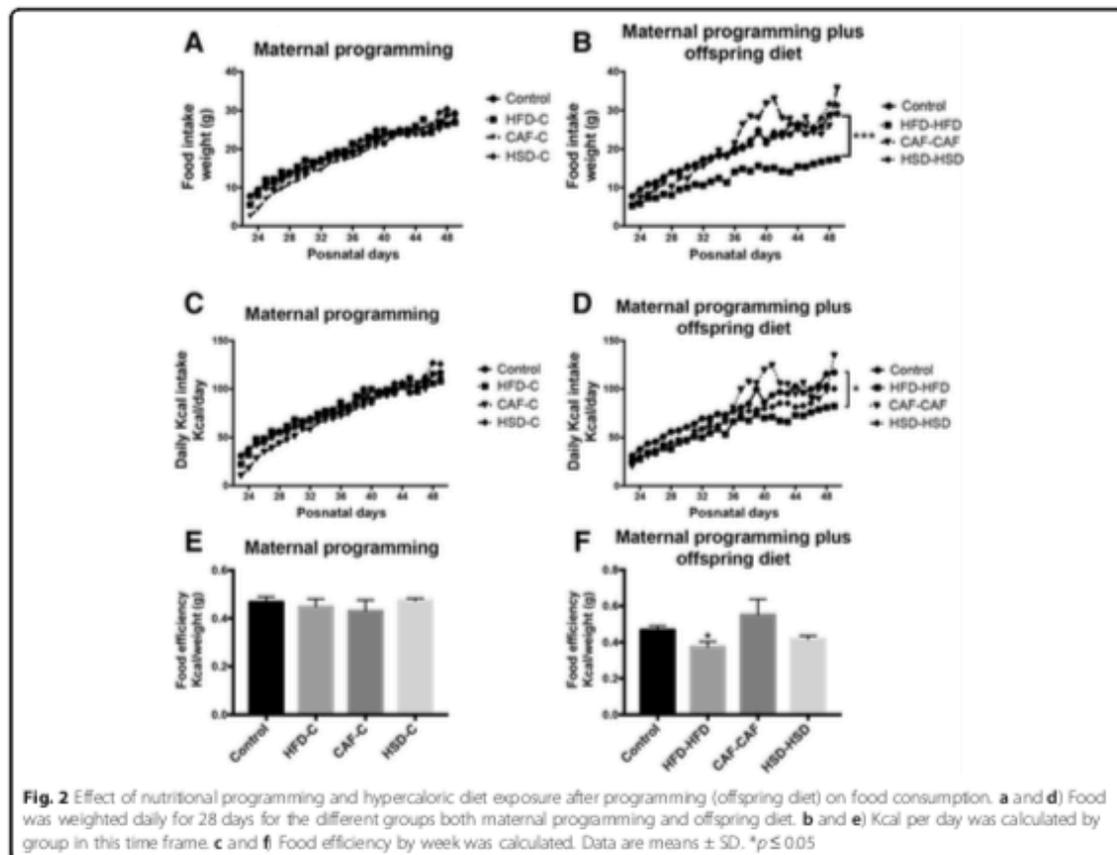
Selective nutritional programming alters pregnancy ratio, body weight and food intake in offspring

Our aim was to evaluate the effect of nutritional programming by maternal hypercaloric diets in mitochondrial dynamics in the hypothalamus of the offspring and evaluate if this effect is exacerbated when offspring is exposed to these formula after weaning. We determined the effect of hypercaloric diets on body weight of female Wistar rats pre-mating, mating and during gestation (Fig. 1b). Female rats were fed with hypercaloric formula (HFD, CAF or HSD) do not modify body weight before mating; however, there was a significant decrease in female body weight during CAF exposure at 5–7 weeks and there were no changes during HFD and HSD exposure (Fig. 1b). While alterations in insulin and leptin levels have been found in mothers fed hypercaloric diets during pregnancy and lactation [29–31],

it is important to point out that in our murine model, maternal hypercaloric diet intake does not develop obesity in mothers. Our main aim at this stage was to identify metabolic changes in male offspring linked to maternal over nutrition. To address this aim, pups (male and female) from mothers were randomized at the age of 3 weeks in 7 experimental groups as previously described. Initially, we found that nutritional programming by CAF diet decreased offspring weight whereas HSD litters increases their body weight at birth (Fig. 1c). Next, we assessed weight during 6–7 weeks of age of male offspring. The HFD-C group showed an increase in body weight at 6–7 weeks old when compared to control group, similar to their mothers (Fig. 1d). Offspring exposed to CAF diet programming (CAF-C) showed a decreased in total body weight at age of 4–5 weeks old and caught up control body weight at 6 weeks (Fig. 1d). Also, hypercaloric challenged after weaning showing in the HFD-HFD offspring group, decreased weight at 5–6 weeks and caught up control body weight at 7 weeks (Fig. 1e). Moreover, CAF-CAF diet exposure decreased body weight from week 4 to week 7 of age and they did not recover to control values (Fig. 1e). Finally, during the

HSD-HSD exposure we do find a significant decrease in body weight at week 5 which caught up to control values at week 6 (Fig. 1e).

Next, we quantified the total food intake and body weight every day in male offspring linked to diets exposure between 23 to 49 days of age. Subjects from the HFD-C, CAF-C and HSD-C groups did not show change in food intake consumption or total kcal/day intake (Fig. 2a). By contrast, hypercaloric diet exposure after programming in the HFD-HFD group showed a decrease in food intake and had less kcal/day intake when it was compared to Chow control group (Fig. 2b), this contrast with their weight where we did not found difference in compare with control group at age of 7 weeks (Fig. 2b, c, d and Fig. 1e). Worthy of note, the CAF-CAF group had hyperphagic behavior from day 36 to day 45 of age and decreased weight when compared with control group from 4 week until 7 week of age (Fig. 2b, c, d and Fig. 1e). Lastly, we evaluated food efficiency by showing the kcal/weight ratio and observed that HFD maternal programming does not affect food efficiency (Fig. 2e); however, fat hypercaloric surplus after programming in the HFD-HFD



group, displayed a significantly decrease in food efficiency (Fig. 2f). These results suggest that maternal programming by HFD and CAF exposure led to failure in their weight and energy homeostasis, and these alterations were exacerbated in their offspring fed with HFD and CAF diets after weaning.

Cafeteria diet exposure during pregnancy and lactation disrupts glucose sensitivity in male offspring

Male offspring tolerance to glucose and insulin was analyzed at 7 and 8 weeks old by performing GTT and ITT, respectively, to determine whether hypercaloric diets disrupt glucose sensitivity. Initially, we found no significant differences in basal glucose levels in the seven experimental groups during GTT test (Fig. 3a, d). Additionally, there were no changes in glucose sensitivity evaluated during the GTT in maternal programming groups (HFD-C, HSD-C) and in the offspring hypercaloric exposure after programming (HFD-HFD, HSD-HSD and CAF-CAF) (Fig. 3b, c, e, f). Besides, nutritional programming by CAF-C exposure decreased plasma glucose concentration and showed a significant decrease in AUC (area under the curve) during the GTT (Fig. 3b, c). Next, during the ITT the HFD-C group displayed an increase in basal glucose plasma levels when compared to Chow control group (Fig. 3g). Also, ITT showed reduced insulin sensitivity in HFD-C and CAF-C groups during versus Control (Fig. 3h, i) and significant increase in AUC for HFD-C group (Fig. 3i). There were no changes in insulin sensitivity in HSD-C, CAF-CAF and HSD-HSD groups (Fig. 3j, k, l). These results suggest that maternal programming by HFD and CAF exposure might affect glucose homeostasis in male young offspring.

Afterwards, we determined leptin and insulin plasma levels associated to maternal diet and hypercaloric diets in offspring after weaning. We found that maternal programming by HFD and CAF or HSD (HFD-C and CAF-C or HSD-C) increase plasma insulin and leptin concentration, respectively (Table 2). Also, the plasma insulin and leptin concentration were found increased in the groups HFD-HFD and CAF-CAF when they were compared to Chow control group (Table 2).

Finally, total triglycerides (TG) and selective species were identified by lipidomic approach in the offspring. We analyzed 57 selective TG species and we found that CAF diet exposure was the most selective formula to show robust TG changes in plasma. On this context, maternal programming by HFD, CAF or HSD does not change total TG levels in offspring (Fig. 4a); however, CAF exposure during programming and after weaning in the CAF-CAF group promotes increase in total TG species (Fig. 4b). Also, maternal programming by CAF promotes increases in the selective TG species: 16: 0/36:4, 18: 2/34:1 + 1, and a decrease in 16: 0/36: 2 + 1, 16: 1/34: 2 + 1, 18: 1/32:0 + 1 and 18: 1/32:1 + 1 (Fig. 4c). Of note, CAF diet exposure after weaning

increases substantially the plasma levels of the TG species: 16: 0/36:2 + 1, 16: 0/36:4, 18: 0/34:1, 18: 0/36:2, 18: 1/32:0 + 1, 18: 1/36:2 + 1, 18: 2/34:1 + 1, 18: 2/36:2 and decrease the 16: 0/36: 2 + 1, 16: 1/34: 2 + 1, 18: 1/32:0 + 1 and 18: 1/32:1 + 1 (Fig. 4d). Also, maternal programming promotes increase in 16: 0/36:4, 18: 0/36:2, 18: 2/36:2 and 16: 0/36:2 + 1, 18: 1/32:0 + 1, 18: 1/36:2 + 1 and 18: 2/34:1 + 1 for HFD and HSD, respectively; and 18: 1/36:2 + 1, 18: 2/34:1 + 1 for both programming groups (Fig. 4d).

Nutritional programming by cafeteria diet modifies liver and white adipose tissue weight in male offspring

Next, we sought to identify the effect of diets exposure during pregnancy and lactation on liver and retroperitoneal white adipose tissue weight. We identified that maternal programming by HFD, CAF or HSD exposure did not change liver weight in offspring males (Fig. 5a). On the other hand, hypercaloric surplus after weaning in the HFD-HFD group showed a decrease in liver weight when compared to control group (Fig. 5b). Also, we found that maternal metabolic programming by fat in the HFD-C group led to an increase of retroperitoneal white adipose tissue weight when it was compared to control group (Fig. 5c). Finally, hypercaloric exposure by fat or sugar intake after maternal programming, in HFD-HFD, HSD-HSD and CAF-CAF groups, increased retroperitoneal white adipose tissue weight with respect to the Chow control group (Fig. 5d).

Hypercaloric diet exposure during pregnancy and lactation promotes hypothalamic mitochondria fusion and ER stress response in male offspring

We sought to identify the effect of nutritional programming by hypercaloric diet exposure on hypothalamic mitochondria dynamics evidenced by changes in expression of proteins involved in mitochondria fusion (MFN 2, Opa 1) and/or fission (DRP 1). We found that HFD-C, HFD-HFD and HSD-HSD diets exposure led to a significant decrease in the hypothalamic DRP1 protein expression in offspring (Fig. 6a and c). By contrast, HFD-C, HFD-HFD, CAF-CAF and HSD-HSD diets showed an increase in the protein expression of MFN2 in hypothalamus (Fig. 6b and c). These data suggest that hypercaloric diet exposure during pregnancy potentially promoted positive hypothalamic mitochondrial fusion. Next, based on the results of metabolism and protein expression found in the groups of HFD-C, HFD-HFD and CAF-CAF, we quantified their mRNA expression of MFN2, Opa 1 and DRP 1 genes. We identified that HFD-C, HFD-HFD or CAF-CAF groups showed decrease expression of MFN 2 mRNA (Fig. 6d). We did not find significant differences in the mRNA expression of DRP1 and Opa 1 genes (Fig. 6e and f). We also analyzed the expression of Ip3r1, which is related to calcium homeostasis between ER and mitochondria and it has been

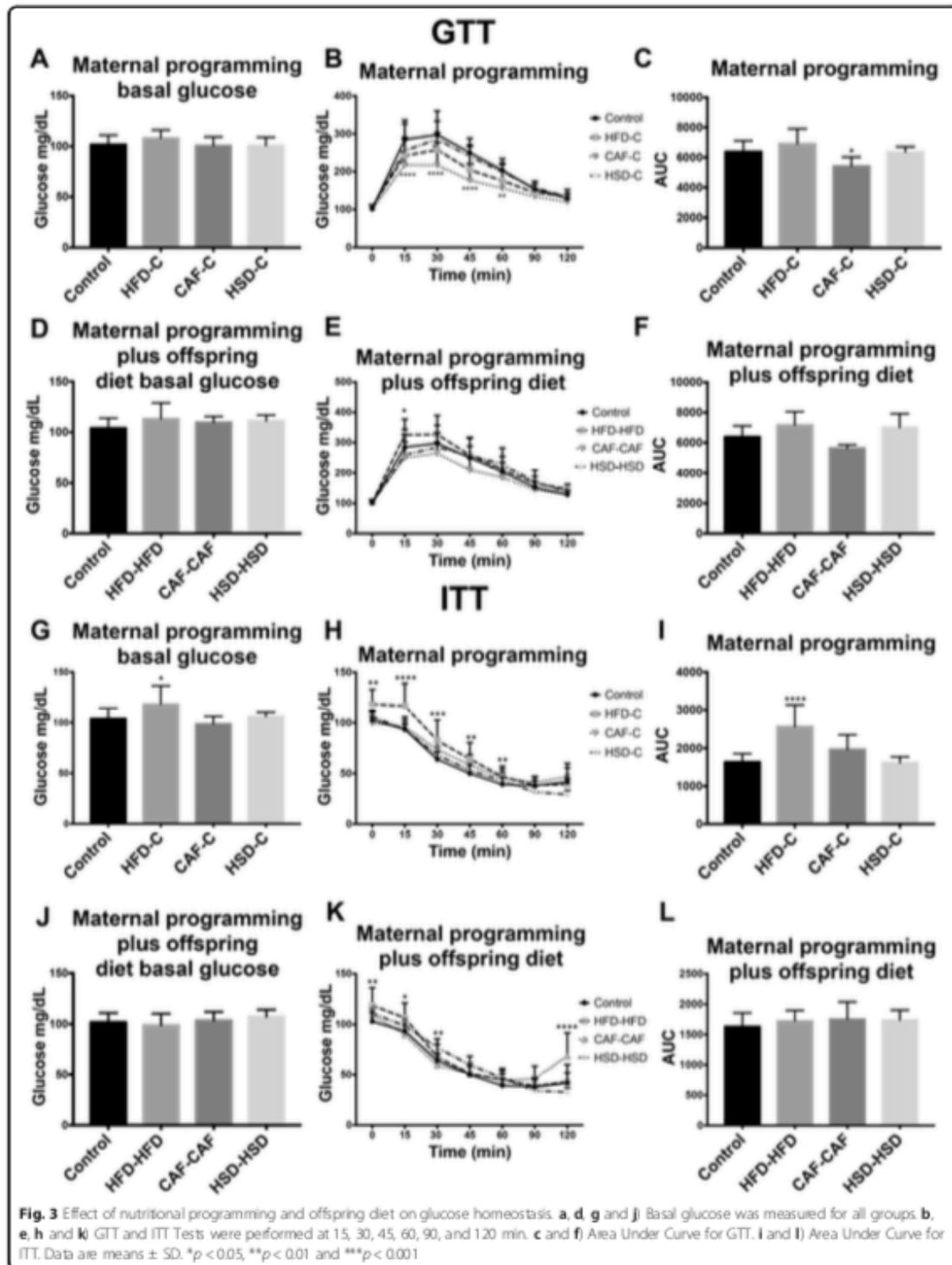
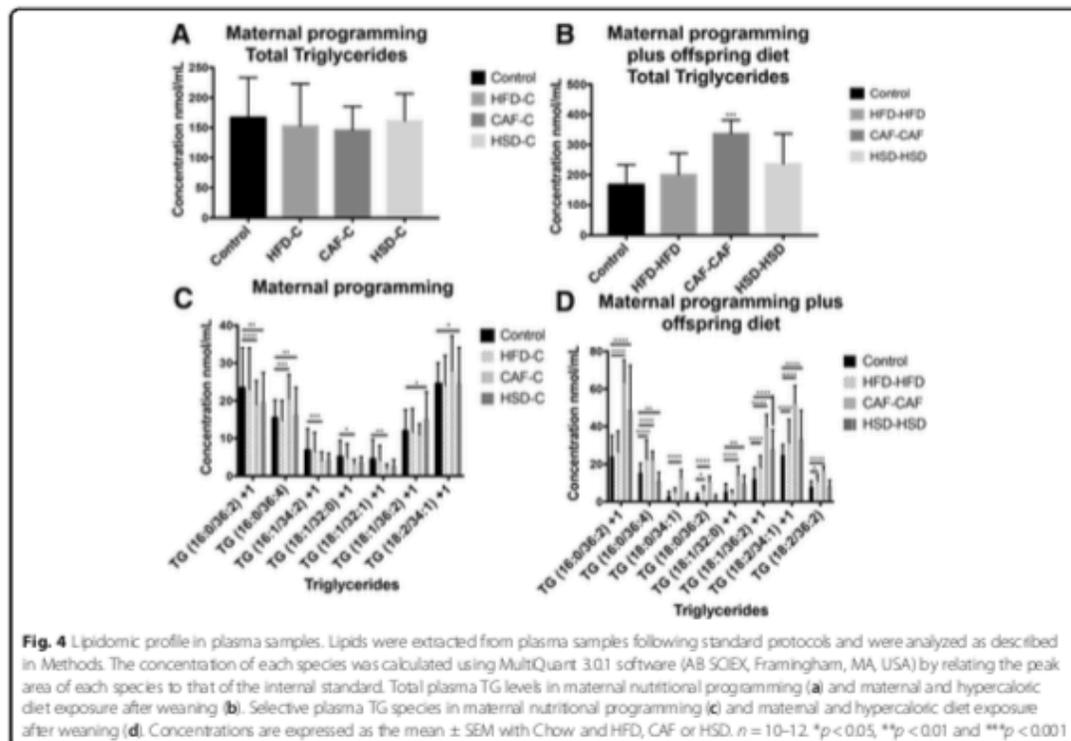
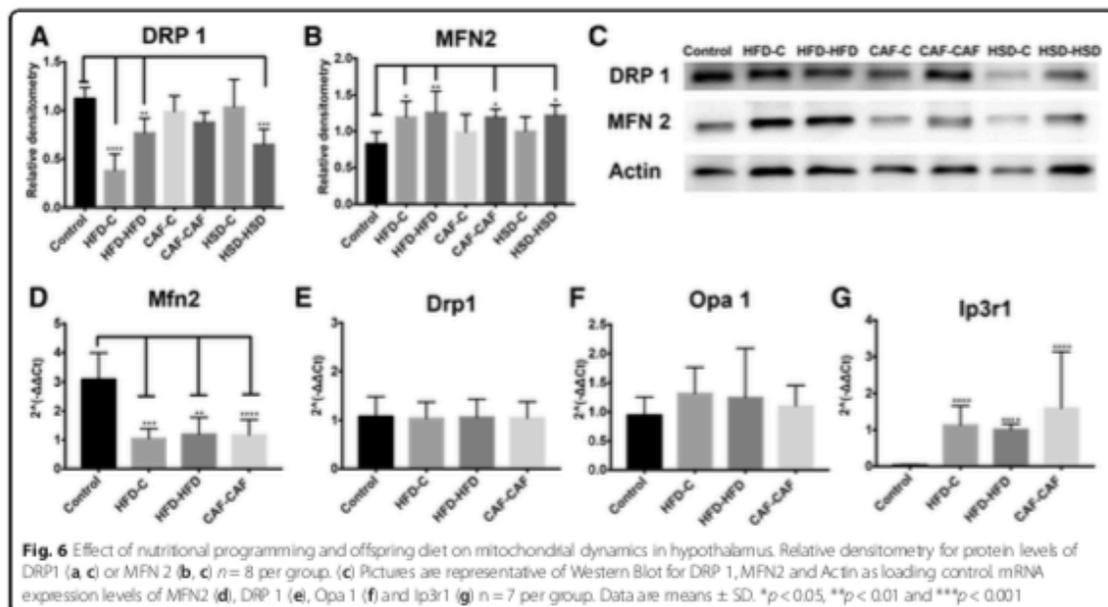
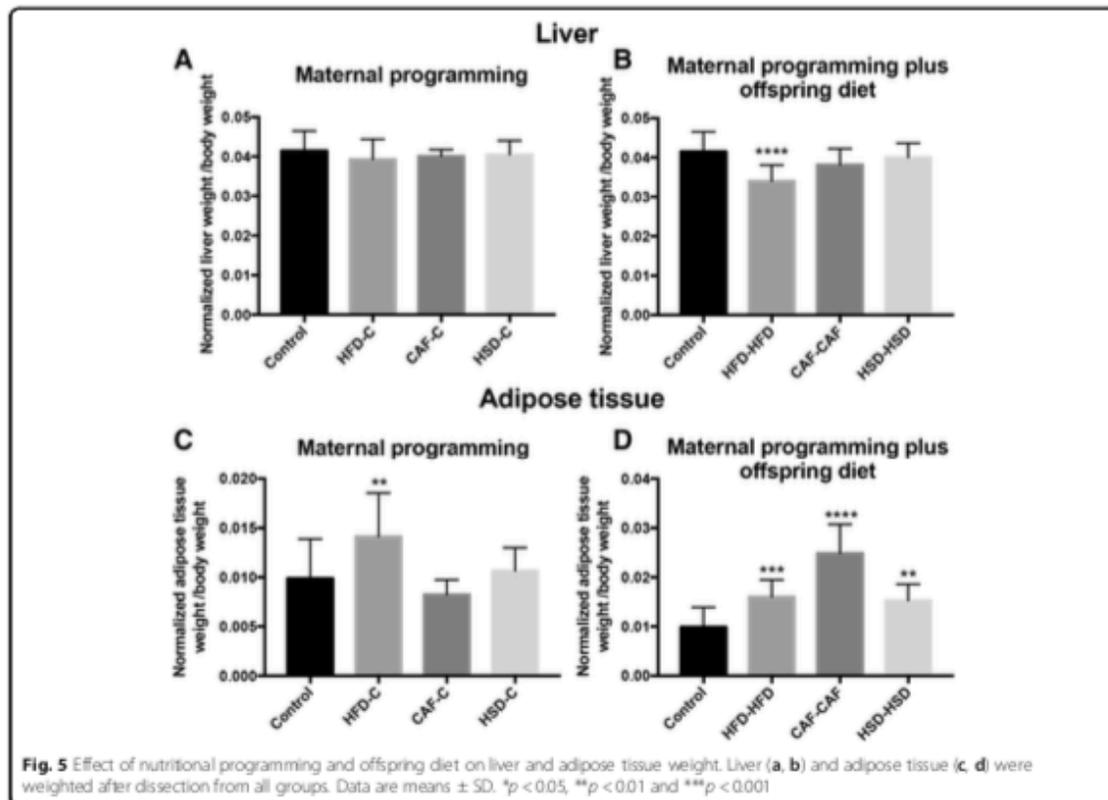


Table 2 Concentrations of insulin and leptin

| Insulin | | | | |
|--|---------|---------------------|---------|------------|
| Experiment | Group | Concentration ng/μL | SD | P value |
| Maternal programming | Control | 0.0782 | 0.0033 | N/A |
| | HFD-C | 0.163 | 0.055 | 0.0009*** |
| | CAF-C | 1.234 | 0.4971 | 0.6189 |
| | HSD-C | 0.074 | 0.0142 | 0.9617 |
| Maternal programming plus diet offspring | Control | 0.0782 | 0.0033 | N/A |
| | HFD-HFD | 0.2478 | 0.0808 | 0.0001**** |
| | CAF-CAF | 0.2644 | 0.0542 | 0.0001**** |
| | HSD-HSD | 0.08941 | 0.0071 | 0.951 |
| Leptin | | | | |
| Experiment | Group | Concentration ng/μL | SD | P value |
| Maternal programming | Control | 0.0671 | 0.0191 | N/A |
| | HFD-C | 0.063 | 0.0099 | 0.7709 |
| | CAF-C | 17.026 | 3.983 | 0.0001**** |
| | HSD-C | 0.0526 | 0.0031 | 0.0355* |
| Maternal programming plus diet offspring | Control | 0.0671 | 0.0191 | N/A |
| | HFD-HFD | 0.1036 | 0.0189 | 0.0007**** |
| | CAF-CAF | 0.09779 | 0.0202 | 0.0002**** |
| | HSD-HSD | 0.05895 | 0.00496 | 0.5173 |





reported upregulated in obesity or lipotoxicity [21]. Offspring fed with HFD or CAF after maternal programming (HFD-HFD and CAF-CAF) increased the mRNA expression of *Ip3r1* gene (Fig. 6g).

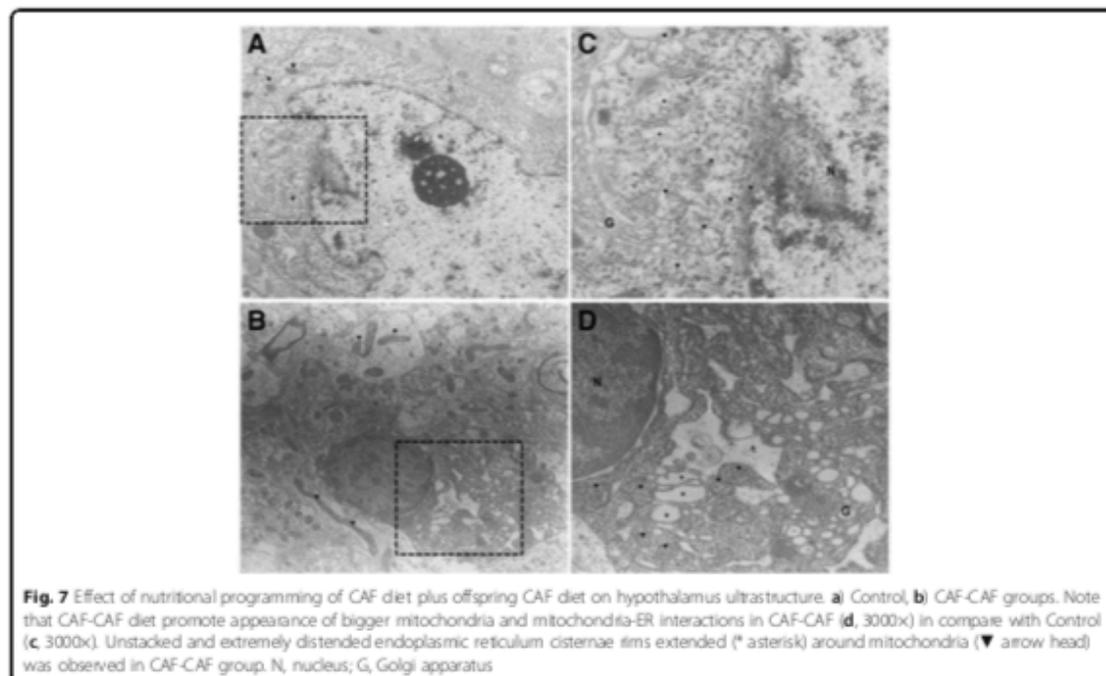
Additionally, we identified morphological alterations in ER and mitochondria in CAF-CAF, and Control experimental groups by using TEM. We chose CAF-CAF because is one of the groups with the greatest difference in metabolism and mitochondrial dynamics. We observed that nutritional programming and offspring intake of hypercaloric diet after weaning in the CAF-CAF group promotes evident hypothalamic ER disorganization, with unstacked cisternae rims, which were extremely distended and surrounding mitochondria and bigger mitochondria (Fig. 7b and d). These results indicated an increase in the ER-mitochondria contacts and confirm our previous findings at molecular level showing that CAF-CAF intake lead to mitochondrial fusion and ER dysfunction.

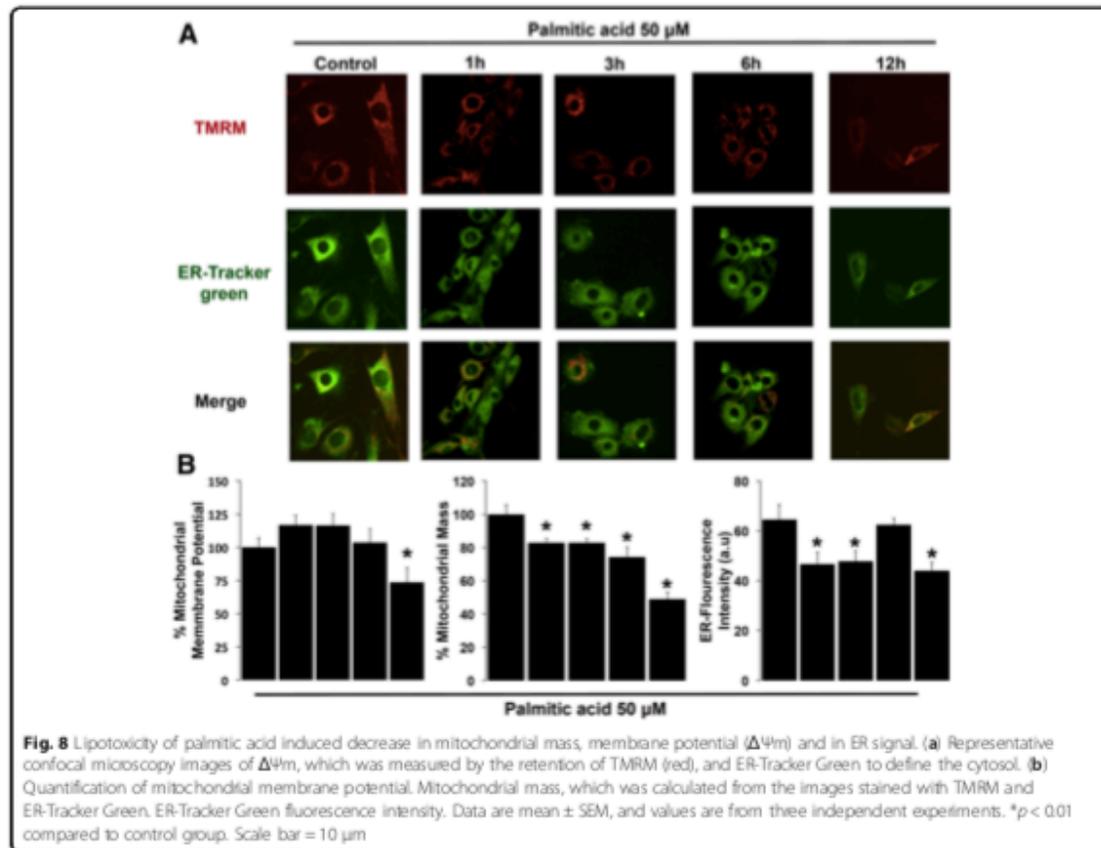
Lipotoxicity of saturated fatty palmitic acid induced decrease of ER signal, mitochondrial mass, membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and mitochondrial calcium overload

Based on our previous results showing that hypercaloric diet exposure promoted an increase in mitochondrial fusion and in endoplasmic reticulum *Ip3r1* mRNA expression in hypothalamus, and, that CAF diet exposure after weaning (CAF-CAF group) increases mitochondrial fusion and ER contacts in offspring, we sought to determine the

physiological role of ER-mitochondria. It has been reported that positive energy balance during obesity promotes enhanced ER-mitochondria contacts, modulated mitochondria physiology by calcium fluxes [21]. We analyzed in an in vitro system whether the lipotoxicity insult induced by the saturated fatty palmitic acid modulates calcium fluxes from ER to mitochondria triggering mitochondrial dysfunction. Hypothalamic cells were loaded with TMRM, treated with the indicated conditions and were quantified as described using confocal microscopy to determine changes in $\Delta\Psi_m$ (Fig. 8a). Palmitic acid stimulation during 1 and 3 h to hypothalamic cells induced an increase of $\Delta\Psi_m$, however after 6 h of treatment we found a decrease of $\Delta\Psi_m$, this effect was exacerbated at 12 h (Fig. 8b), showing that palmitic acid induces mitochondrial dysfunction.

To assess mitochondrial mass and ER function, cells were co-loaded with TMRM to label mitochondria and with ER-Tracker Green, which aid to label the cytosol, allowing measurement of the volume occupancy of the mitochondrial network within the dimensions of the cytosol and ER (Fig. 8b). At 1, 3 and 6 h after palmitic acid treatment we identified a significant decrease in mitochondrial mass (Fig. 8b), which was more evident at 12 h of treatment with palmitic acid. Similarly, we observed a decrease in the ER-Tracker Green fluorescence intensity when hypothalamic cells were treated for 1 and 3 h and an increase at 6 h. However, at 12 h we observed





again a decrease similar to the one observed at 1 and 3 h, which indicates ER stress (Fig. 8b). These results showed that lipotoxic insult promotes time-dependent hypothalamic mitochondria and ER dysfunction.

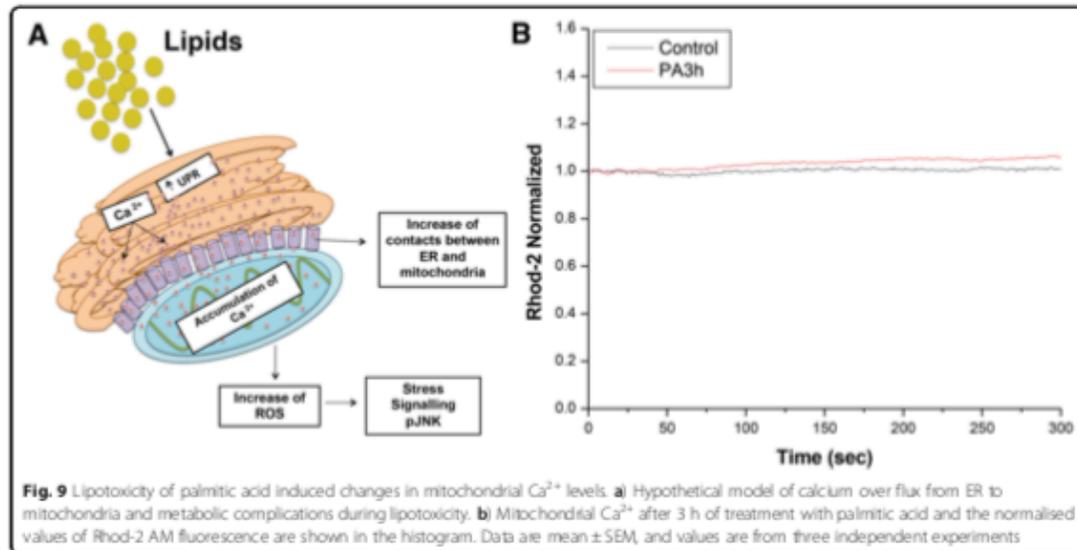
Next, we sought to identify time-dependent changes in mitochondrial Ca^{2+} levels during lipotoxicity of saturated fatty palmitic acid stimulation. After 3 h of treatment with palmitic acid, cells were incubated with the mitochondrial Ca^{2+} indicator Rhod-2 AM. Palmitic acid-treated cells exhibited a slight increase in Rhod-2 fluorescence, indicating elevated mitochondrial Ca^{2+} levels (Fig. 9).

Discussion

Obesity and maternal overnutrition during pregnancy lead to several metabolic changes that trigger chronic related diseases including Type 2 diabetes mellitus (T2MD) in offspring [7, 13, 14, 20]. We sought to identify whether hypercaloric diets exposure including HFD, CAF and HSD, during pregnancy and lactation selectively modulates body metabolic parameters and hypothalamic mitochondrial dynamics in male offspring after weaning. We compared the hypercaloric formula to standard chow diet

formula which has low fat or carbohydrates percentage. Diet might be the major driving force behind changes in parameters as microbiota [32] and also CAF diet is considered a robust model of metabolic syndrome when it is compared to HFD [33]. In this context, we identified that selective maternal overnutrition and hypercaloric exposure in male offspring after weaning using the HFD or CAF diets led to body weight alterations and increase in glucose, insulin, leptin and TG levels. Also, we found that HFD maternal programming is effective to promote hypothalamic mitochondria fusion as well as the consumption of the HFD, CAF and HSD diets by the offspring after maternal programming.

Our initial results showed that dams subjected to CAF formula weight significantly less before delivery when compare to control, HFD or HSD diets. In offspring, we found that CAF diet decreased birthweight and whereas HSD increased birthweight. It is known that maternal overnutrition and obesity in females might impact survival and normal development in offspring [13, 14] and also increase body weight in rats and in non-human primates with diets like HSD [31, 34, 35]. In fact, there is evidence that maternal HFD



exposure in rats does not promote changes in offspring body weight at birth [36]. A recent meta-analysis study showed that maternal HFD increased birth weight in male mice, and there was a trend in male rats to show low birth weight [37]. We hypothesized that no correlation from our results compared with previous studies might be potentially due to the murine strain, age and time of diet exposure, as reported previously [36, 38, 39].

Next, we identified the effect of nutritional programming after weaning in body weight of offspring. At this stage, we modulated hypercaloric surplus in offspring by exposure to Chow control diet or keep them with the hypercaloric mother's diet. We found that maternal HFD exposure (HFD-C group) increases body weight whereas HFD-HFD and CAF-CAF decrease body weight at 5th–6th and 4th–7th weeks of age respectively, compared with Control group. Also, CAF exposure after maternal programming (CAF-CAF group) had an increase in food intake at 6th week. Supporting our findings, CAF formula decreases rate of growth shortly after its exposure [40], and on the other hand, maternal programming by HFD exposure leads to body weight increase in mice offspring [31] tentatively associated to hyperphagia from 5 to 6 weeks of age [41, 42]. In this context, we did not find difference between HFD-C and Control group in food intake; however, the HFD-HFD group where dams and offspring were fed HFD displayed a substantial decrease in food intake, disruption in food efficiency and body weight versus Control group. These results suggest that developmental nutritional programming might set up a threshold to increase the susceptibility to metabolic dysfunction. In any case, it would be potentially important to determine

food intake at adulthood to define time dependent effects of hypercaloric exposure before and after weaning.

Our data showed that maternal programming by CAF-C decreases plasma glucose levels during the GTT analysis, whereas the HFD-C group showed an increase in plasma glucose during ITT test. These results partially agree with previous reports showing maternal HFD effect on glucose increase at 6 weeks of age in offspring [31, 43] and with the fact that maternal HFD reduced insulin tolerance [42]. In addition, CAF diet exposure increases plasma glucose levels in male and female offspring at the age of 3 months [44]. No correlations between our results and the reported by Desai et al. 2014 and Melo et al. 2014, might be related to the age of the subjects, 24 weeks versus 8 weeks from our studies [31, 43]. However, we do report that nutritional programming by HFD or CAF decrease insulin sensitivity and enhance glucose metabolism during the ITT and GTT, respectively. Also, hypercaloric stimuli by HFD or CAF exposure after maternal programming lead to an increase in plasma insulin, leptin and TG lipid species levels compared to control, which correlates with an increase in retroperitoneal white adipose tissue weight in these groups as well as a decrease in liver weight in HFD-HFD and CAF-CAF. These results agree with previous data reported where increased leptin and insulin concentrations were found in young rats and obese rats on HFD [45–47]. Our data also show that compare to HFD and HSD which also show glucose, leptin and insulin deregulation, the consumption of CAF diet after weaning in offspring seems to be the most significant nutritional formula to promote changes in total TG plasma concentrations and in selective TG species. The change in the profiles of triglycerides, ceramides and dhCer

have been linked to insulin resistance and obesity [48] and alterations in the expression of ceramide synthase and dihydroceramide desaturase increasing lipotoxicity [49, 50]. Additionally, our data correlate with negative effects on normal organ weight during hypercaloric nutritional programming [31]. Overall, we speculate that initial metabolic, hormonal and organ weight alterations in offspring at 8 weeks, found in our experimental models, might compromise basal metabolic settings and potentially increase the susceptibility to glucose imbalance in the adulthood.

Metabolic programming during maternal overnutrition and obesity leads to ER stress activation [13, 14, 31, 51, 52], and mitochondrial dysfunction in oocytes and embryos [14, 20], and impairs hypothalamic glucose metabolism in male offspring [53]. It is known that mitochondrial dynamics is regulated by cellular bioenergetic demands [54]. For instance, during high energy demand mitochondrial fusion results in extended mitochondrial networks which provides advantage to cell homeostasis; however, disruption of mitochondrial fusion has been shown to result in energy failure and mitochondrial dysfunction [54]. Here we added new evidence by showing that HFD-C, HFD-HFD, CAF-CAF and HSD-HSD exposure decrease the mitochondrial fission marker DRP1 and increase the fusion MFN 2 protein marker expression in the hypothalamus of offspring. Of importance, mitochondrial dysfunction shows a lower expression of the mitochondrial fusion marker protein OPA1, which correlates with increased expression of the mitochondrial fission marker protein DRP1 [54]. In our case, we found a negative feedback caused by maternal programming and offspring diet that increase MFN 2 and decrease in DRP 1 protein levels, which potentially suggest positive mitochondria fusion. We have not found correlation between mRNA expression and total protein levels of MFN 2 and DRP1, our observations by TEM suggest an enhance in mitochondria-ER contacts in the offspring of CAF-C group and positive hypothalamic mitochondria fusion, bigger mitochondria and enhance mitochondria-ER contacts in the CAF-CAF group. Hypothalamic DRP1 regulates ROS signaling in glucose sensing [55] and also modulates leptin sensitivity in POMC neurons [56]. DRP1 ablation leads to higher ROS production and dysfunctional mitochondria [57]. On the other hand, others and we have reported up regulation of hypothalamic MFN2 protein levels of obese mice [21, 22], and defective MFN2-expression in POMC or Agrp neurons promotes or prevents obesity in a rodent obese model, respectively [23, 24]. Also, obesity leads to changes in mitochondrial morphology in liver and increases ER-mitochondria junctions [21], suggesting that MFN2 regulation might influence susceptibility to gain more weight during growth, as shown previously and metabolic dysfunction [9, 58]. It would be relevant to determine selective changes in mitochondrial dynamics in adulthood and identify whether there is a potential transgenerational

effect, as has been reported in other animal models [20]. Overall, our data propose that hypercaloric nutritional programming leads to exacerbation of mitochondria fusion in hypothalamus, which correlates, with metabolic compromise in offspring.

Finally, we tested the hypothesis whether increase in mitochondria fusion and ER-mitochondria contacts are potential negative modulators of mitochondria metabolism. It has reported that the onset of mitochondrial dysfunction is secondary to ER stress and Ca^{2+} release [59, 60]. We initially identified that HFD-C decreases expression of Hspa5 and HFD-C, HFD-HFD and CAF-CAF manipulation increases Ip3r1 expression, two ER calcium markers. We found that palmitic acid stimulation to hypothalamic cells leads to ER stress, which correlates with a decrease in both mitochondrial membrane potential and mitochondrial mass at 6 h. Of note, palmitic acid stimulation increases mitochondrial Ca^{2+} levels at earlier time-course such as 3 h after treatment. This supports the hypothesis that lipotoxic stimulation with palmitic acid promotes initial Ca^{2+} release from ER leaking to mitochondria matrix and tentatively promote mitochondrial dysfunction. These results also agree with the increase of the expression of Ip3r1 in maternal hypercaloric diets, given its role on Ca^{2+} flux from ER to mitochondria [21, 59, 61].

Conclusions

Maternal programming by HFD, CAF or HSD increase insulin and leptin plasma levels, respectively, however, HFD maternal programming exposure is potentially effective in promoting hypothalamic mitochondria fusion and ER stress in the offspring. Positive mitochondria fusion is replicated in male offspring programmed by HFD, CAF and HSD and exposure to HFD, CAF and HSD after weaning, which correlate with failure in glucose, leptin and insulin sensitivity and fat accumulation for the HFD and CAF nutrient exposure. We suggest that lipotoxic insults related to lipid overload might lead to mitochondrial dysfunction linked to calcium overload by the ER-mitochondria crosstalk.

Abbreviations

C: Control; CAF: Cafeteria diet; DIO: Diet induced obesity; DRP1: Dynamin-related protein 1; ER: Endoplasmic reticulum; GTT: Glucose tolerance test; HFD: High Fat Diet; HSD: High Sugar Diet; Ip3r1: Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1; ITT: Insulin tolerance test; MFN2: Mitofusin 2; mRNA: Messenger RNA; OPA1: Optic Atrophy type 1; POMC: Proopiomelanocortin; ROS: Reactive Oxygen Species; T2DM: Type 2 diabetes mellitus; TEM: Transmission electron microscopy; TMRM: Tetramethylrhodamine

Acknowledgements

We thank Sergio Lozano-Rodriguez, M.D. of the Scientific Publications Support Coordination, School of Medicine, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, for his critical reading and comments on the manuscript

Funding

This work was funded by the National Council of Science and Technology in Mexico (CONACYT) (Grant number: 255317 and 261420) and the IBRO-PROLAB 2016 for A.C.

Availability of data and materials

Data and material are available under request.

Authors' contributions

RECP and AC conceived and designed the study. RECP, LFM, ANDL, ITV, LRC, JCCC, AGG and HRR carried out the experiments. JS and MF performed lipidomics analysis of serum samples from our murine models. RECP analyzed the data, and RECP, AT, EZ and ROL discussed and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval

The procedures for the care and use of experimental animals followed the protocols and regulations set forth by Animal Care Committee of Medicine Faculty of Universidad Autónoma de Nuevo León (Register number B0002).

Consent for publication

All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico. ²Unidad de Neurometabolismo, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico. ³Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública, Facultad de Salud Pública y Nutrición, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico. ⁴Departamento Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Mexico City, Mexico. ⁵Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran, Mexico City, Mexico. ⁶Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico. ⁷Laboratorio de Neurociencias, Hospital Infantil de México, Federico Gómez, México City, Mexico. ⁸Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Instituto Tecnológico de Monterrey, Monterrey, Mexico. ⁹Genetics and Molecular Pathology, SA Pathology at Women's and Children's Hospital, University of Adelaide, Adelaide, Australia. ¹⁰Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ave. Francisco I Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño s/n. Colonia Mitras Centro, CP. 64460 Monterrey, Nuevo León, Mexico.

Received: 12 February 2018 Accepted: 23 May 2018

Published online: 05 June 2018

References

- Gaillard R, et al. Childhood consequences of maternal obesity and excessive weight gain during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2014;93(11):1085–9.
- Li M, Sibbald D, Vickers M. Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal models. *Exp Diabetes Res.* 2011;2011.
- Alfaradhi MZ, et al. Maternal obesity in pregnancy developmentally programs adipose tissue inflammation in young, lean male mice offspring. *Endocrinology.* 2016;157(11):4246–56.
- Gluckman PD, et al. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med.* 2008;359(1):61–73.
- Ohta T, et al. Maternal high-fat diet promotes onset of diabetes in rat offspring. *Anim Sci J.* 2017;88(1):149–55.
- Zambrano E, et al. RAPID REPORT: dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J Physiol.* 2010;588(10):1791–9.
- Zambrano E, et al. Decreased basal insulin secretion from pancreatic islets of pups in a rat model of maternal obesity. *J Endocrinol.* 2016;231(1):49–57.
- Taylor P, Samuelsson AM, Poston L. Maternal obesity and the developmental programming of hypertension: a role for leptin. *Acta Physiol.* 2014;210(3):508–23.
- Frihauf JB, et al. Maternal Western diet increases adiposity even in male offspring of obesity-resistant rat dams: early endocrine risk markers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016;311(6):R1045–59.
- Wankhade UD, et al. Enhanced offspring predisposition to steatohepatitis with maternal high-fat diet is associated with epigenetic and microbiome alterations. *PLoS One.* 2017;12(4):e0175675.
- Laheva V, et al. Role of mitochondrial dysfunction in hypertension and obesity. *Curr Hypertens Rep.* 2017;19(2):11.
- Igosheva N, et al. Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. *PLoS One.* 2010;5(4):e10074.
- McPherson ND, et al. When two obese parents are worse than one: impacts on embryo and fetal development. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;309(6):E568–81.
- Wu LL, et al. Mitochondrial dysfunction in oocytes of obese mothers: transmission to offspring and reversal by pharmacological endoplasmic reticulum stress inhibitors. *Development.* 2015;142(4):681–91.
- Burgueño AL, et al. Maternal high-fat intake during pregnancy programs metabolic syndrome-related phenotypes through liver mitochondrial DNA copy number and transcriptional activity of liver PPARGC1A. *J Nutr Biochem.* 2013;24(1):6–13.
- Rodríguez L, et al. Maternal fructose intake induces insulin resistance and oxidative stress in male, but not female, offspring. *Journal of nutrition and metabolism.* 2015;2015.
- Duan Y, et al. Prepregnancy maternal diabetes combined with obesity impairs placental mitochondrial function involving Nrf2/ARE pathway and detrimentally alters metabolism of offspring. *Obesity research & clinical practice.* 2017.
- Youle RJ, Van Der Bleek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science.* 2012;337(6098):1062–5.
- Pileggi CA, et al. Maternal high fat diet alters skeletal muscle mitochondrial catalytic activity in adult male rat offspring. *Front Physiol.* 2016;7:546.
- Saben JL, et al. Maternal metabolic syndrome programs mitochondrial dysfunction via germline changes across three generations. *Cell Rep.* 2016;16(1):1–8.
- Aruda AP, et al. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat Med.* 2014;20(12):1427.
- Diaz B, et al. Saturated lipids decrease mitofusin 2 leading to endoplasmic reticulum stress activation and insulin resistance in hypothalamic cells. *Brain Res.* 2015;162780–9.
- Dietrich MO, Liu Z-W, Horvath TL. Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins regulate AgRP neuronal activity and diet-induced obesity. *Cell.* 2013;155(1):188–99.
- Schneeberger M, et al. Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell.* 2013;155(1):172–87.
- Schrepler E, Scorrano L. Mitofusins, from mitochondria to metabolism. *Mol Cell.* 2016;61(5):683–94.
- Prieur X, et al. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes.* 2011;60(3):797–809.
- Camacho A, Montiel T, Massieu L. Sustained metabolic inhibition induces an increase in the content and phosphorylation of the NR2B subunit of N-methyl-D-aspartate receptors and a decrease in glutamate transport in the rat hippocampus in vivo. *Neuroscience.* 2007;145(3):873–86.
- Camacho A, et al. Ablation of PGC1 beta prevents mTOR dependent endoplasmic reticulum stress response. *Exp Neurol.* 2012;237(2):396–406.
- Bayol SA, Farington SJ, Stickland NC. A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Br J Nutr.* 2007;98(4):843–51.
- Holemans K, et al. Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* 190(3): p. 858–865.
- Melo AM, et al. Hypothalamic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring of mice dams fed high-fat diet during pregnancy and lactation. *Metabolism-Clinical and Experimental.* 2014;63(5):682–92.
- Bordin RC, et al. A new animal diet based on human western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in terms of metabolic and gut microbiota disruption. *Int J Obes.* 2017;42:525.
- P, S.B, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity.* 2011;19(6):1109–17.

34. Reginato A, et al. Autophagy proteins are modulated in the liver and hypothalamus of the offspring of mice with diet-induced obesity. *J Nutr Biochem*. 2016;34:30–41.
35. Sullivan EL, et al. Maternal and postnatal high-fat diet consumption programs energy balance and hypothalamic melanocortin signaling in nonhuman primate offspring. *Am J Phys Regul Integr Comp Phys*. 2017; 313(2):R169–79.
36. Chen H, et al. Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. *Endocrinology*. 2008;149(11):5348–56.
37. Ribaroff G, et al. Animal models of maternal high fat diet exposure and effects on metabolism in offspring: a meta-regression analysis. *Obes Rev*. 2017;18(6):673–86.
38. Bautista C, et al. Maternal obesity in the rat impairs male offspring aging of the testicular antioxidant defence system. *Reprod Fertil Dev*. 2017;29(10):1950–7.
39. Cordero P, et al. Supplementation with methyl donors during lactation to high-fat-sucrose-fed dams protects offspring against liver fat accumulation when consuming an obesogenic diet. *J Dev Orig Health Dis*. 2014;5(5):385–95.
40. Prats E, et al. Energy intake of rats fed a cafeteria diet. *Physiol Behav*. 1989; 45(2):263–72.
41. Kirk SL, et al. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS One*. 2009;4(6):e5870.
42. White CL, Puppala MN, Morrison CD. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *Am J Phys Regul Integr Comp Phys*. 2009;296(5):R1464–72.
43. Desai M, et al. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2014; 211(3):237. e1–237. e13.
44. Pomar C, et al. Maternal consumption of a cafeteria diet during lactation in rats leads the offspring to a thin-outside-fat-inside phenotype. *Int J Obes*. 2017;41(8):1279.
45. Eu CHA, et al. Glycyrrhizic acid improved lipoprotein lipase expression, insulin sensitivity, serum lipid and lipid deposition in high-fat diet-induced obese rats. *Lipids Health Dis*. 2010;9(1):81.
46. Lalarza JF, et al. Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour. *PLoS One*. 2014;9(1):e85049.
47. Suarez-Garcia S, et al. Impact of a cafeteria diet and daily physical training on the rat serum metabolome. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171970.
48. Tonis KT, et al. Skeletal muscle and plasma lipidomic signatures of insulin resistance and overweight/obesity in humans. *Obesity*. 2016;24(4):908–16.
49. Barbaroja N, et al. Increased dihydroceramide/ceramide ratio mediated by defective expression of *degs1* impairs adipocyte differentiation and function. *Diabetes*. 2014;63(14):4035–44.
50. Hartmann D, et al. Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(4):620–8.
51. Ma W, et al. Maternal obesity in mice not only affects fresh embryo quality but also aggravates injury due to vitrification. *J Assist Reprod Genet*. 2016; 33(11):1515–23.
52. Wu LL-Y, et al. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates. *Endocrinology*. 2010; 151(11):5438–45.
53. Chen H, Simar D, Morris MJ. Maternal obesity impairs brain glucose metabolism and neural response to hyperglycemia in male rat offspring. *J Neurochem*. 2014;129(2):297–303.
54. Srinivasan S, et al. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics—the cancer connection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2017;1858(8):602–14.
55. Cameiro L, et al. Importance of mitochondrial dynamin-related protein 1 in hypothalamic glucose sensitivity in rats. *Antioxid Redox Signal*. 2012;17(3):433–44.
56. Santoro A, et al. DRP1 suppresses leptin and glucose sensing of POMC neurons. *Cell Metab*. 2017;25(3):647–60.
57. López-Lluch G. Mitochondrial activity and dynamics changes regarding metabolism in ageing and obesity. *Mech Ageing Dev*. 2017;162:108–21.
58. Enos RT, Velázquez KT, Murphy EA. Insight into the impact of dietary saturated fat on tissue-specific cellular processes underlying obesity-related diseases. *J Nutr Biochem*. 2014;25(6):600–12.
59. Naon D, et al. Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. *Proc Natl Acad Sci*. 2016; 113(40):11249–54.
60. Pennanen C, et al. Mitochondrial fission is required for cardiomyocyte hypertrophy mediated by a Ca²⁺-calmodulin signaling pathway. *J Cell Sci*. 2014;127(12):2659–71.
61. Muñoz J, et al. Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK. *EMBO J*. 2013;32(17):2348–61.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

