



# Origen neonatal de la síndrome metabòlica en l'adult

Thais Pentinat Pelegrin

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

**ORIGEN NEONATAL DE LA SÍNDROME METABÒLICA EN L'ADULT**

Memòria presentada per Thais Pentinat Pelegrin per optar al títol de  
Doctora per la Universitat de Barcelona  
Barcelona, 2013

La realització d'aquest treball ha comptat amb el suport econòmic de la beca FPI BES-  
2009-012961 associada al projecte BFU-2008-03759, i concedida pel Ministeri  
d'Economia i Competitivitat.

Dr. Josep C Jiménez Chillarón,  
Director

Dr. Rubén Díaz Naderi,  
Co-Director

Dra. Anna M<sup>a</sup> Gómez Foix,  
Tutor

Thais Pentinat Pelegrin,  
Doctoranda



*A les meves germanes,*



*Tot viatge de mil quilòmetres,  
comença per un sol pas.*

Proverbi xinès



# INDEX

ABREVIACIONS	11
<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>15</b>
1. SÍNDROME METABÒLICA	17
1.1 Definició	17
1.2 Mecanismes fisiopatològics	19
1.2.1 Resistència a la insulina	
1.2.2 Obesitat	
1.2.3 Dislipèmia	
1.2.4 Intolerància a la glucosa	
1.2.5 Diabetis tipus 2	
2. ORIGEN DURANT EL DESENVOLUPAMENT DE MALALTIES DE L'ADULT	27
3. HERÈNCIA TRANSGENERACIONAL: EPIGENÈTICA	29
3.1 Herència epigenètica	30
3.2 Influència ambiental	30
<b>HIPÒTESI I OBJECTIUS</b>	<b>31</b>
<b>MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>35</b>
1. MODEL ANIMAL I EXPERIMENTS <i>IN VIVO</i>	37
1.1 Model animal ON	37
1.2 Mesura de la ingesta	37
1.3 Tractament amb <sup>13</sup> C-Acetata	38
1.4 Testos fisiològics	38
1.4.1 Test de tolerància intraperitoneal a la glucosa	
1.4.2 Test de tolerància intraperitoneal a la insulina	
1.4.3 Test de producció de glucosa a partir de piruvat	
1.4.4 Test de síntesi de lipoproteïnes	
1.4.5 Test de sensibilitat perifèrica a la insulina	
1.5 Presa de mostres	39
1.5.1 Obtenció de sèrum	
1.5.2 Obtenció de teixits	
1.5.3 Extracció i aïllament d'illots pancreàtics	
1.6 Anestèsia i eutanàsia	41



2. TÈCNiques DE CULTIU CEL·LULAR I EXPERIMENTS <i>IN VITRO</i>	42
2.1 Secreció d'insulina estimulada per glucosa	42
3. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR	42
3.1 Preparació i anàlisi de ARN	42
3.1.1 Extracció de ARN	
3.1.2 Obtenció de cDNA	
3.1.3 Anàlisi de cDNA per RT-qPCR	
3.2 Anàlisi de proteïnes	45
3.2.1 Preparació d'homogenats	
3.2.2 Valoració de la concentració de proteïna als homogenats	
3.2.3 Anàlisi de proteïnes per Western Blot	
4. TÈCNiques HISTOLÒGIQUES	47
4.1 Preparació de mostres histològiques	47
4.2 Estudi de la mida dels adipòcits i la densitat cel·lular	47
4.3 Mesura de la massa de cèl·lula $\beta$	47
5. DETERMINACIONS BIOQUÍMIQUES	48
5.1 Paràmetres sèrics	48
5.1.1 Determinació de glucosa	
5.1.2 Determinació d'insulina	
5.1.3 Determinació de triglicèrids, glicerol i àcids grassos	
5.1.4 Determinació de colesterol total, colesterol HDL i colesterol lliure	
5.1.5 Determinació de $\beta$ -hidroxibutirat	
5.1.6 Determinació de lactat	
5.1.7 Determinació d'adipoquines	
5.1.8 Anàlisi de lipoproteïnes	
5.2 Paràmetres tissulars	51
5.2.1 Determinació hepàtica i muscular de triglicèrids	
5.2.2 Determinació hepàtica de colesterol total i colesterol lliure	
5.2.3 Determinació hepàtica de fosfolípids	
5.2.4 Determinació hepàtica de glicogen	
5.2.5 Anàlisi de la biosíntesi de polímers	
6. ANÀLISI DE DADES	55

<b>RESULTATS</b>	<b>57</b>
1. CARACTERITZACIÓ DEL FENOTIP ON	59
1.1 Introducció	61
1.2 Resultats	63
1.2.1 Sobrenutrició i creixement postnatal	
1.2.2 Tolerància a la glucosa	
1.2.3 Sensibilitat a la insulina	
1.2.4 Estudi del metabolisme lipídic	
1.2.5 Estudi del metabolisme glucídic	
1.3 Discussió	79
2. PROGRAMACIÓ POSTNATAL DEL FENOTIP ON	85
2.1 Introducció	87
2.2 Resultats	89
2.2.1 Glucèmia i tolerància a la glucosa	
2.2.2 Sensibilitat a la insulina	
2.2.3 Estudi del metabolisme lipídic	
2.3 Discussió	105
3. TRANSMISSIÓ INTERGENERACIONAL DEL FENOTIP ON	109
3.1 Introducció	111
3.2 Resultats	113
3.2.1 Nutrició i creixement postnatal	
3.2.2 Glucèmia i tolerància a la glucosa	
3.2.3 Sensibilitat a la insulina	
3.2.4 Estudi del metabolisme lipídic	
3.3 Discussió	119
<b>DISCUSSIÓ GENERAL</b>	<b>123</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>127</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>131</b>
<b>ANNEX 1</b>	<b>147</b>
Encebadors	
Buffers	
Anticossos	

<b>ANNEX 2</b>	<b>153</b>
Pentinat T et al. Endocrinology, 2010	155
Jiménez-Chillaron JC et al. Biochimie, 2012	163
<b>AGRAÏMENTS</b>	<b>185</b>

## ABREVIACIONS

<b>ACC1</b>	Acetyl-Coa Carboxilase 1
<b>ACC2</b>	Acetyl-Coa Carboxilase 2
<b>Actb</b>	Actina b
<b>ACS</b>	Acyl-Coa Synthetase
<b>ADN</b>	Àcid Desoxiribonucleic
<b>AG</b>	Àcids Grassos lliures
<b>ARN</b>	Àcid Ribonucleic
<b>ADP</b>	Adenosine DiPhosphate
<b>AMP</b>	Adenosine MonoPhosphate
<b>AHA</b>	American Herat Association
<b>Akt</b>	Protein Kinase B
<b>AP2</b>	Activating enhancer Binding Protein 2
<b>Apo B</b>	Apolipoprotein B
<b>ATP</b>	Adenosine TriPhosphate
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumine
<b>C -</b>	Control no estimulat
<b>C +</b>	Control estimulat amb insulina
<b>CD36</b>	Cluster of Differentiation 36
<b>cDNA</b>	ADN copia
<b>CEBPa</b>	CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha
<b>CEEA</b>	Comitè Ètic d'Experimentació Animal
<b>Cpt1a</b>	Carnitine Palmitoyltransferase 1a
<b>Cpt1b</b>	Carnitine Palmitoyltransferase 1b
<b>Cpt2</b>	Carnitine Palmitoyltransferase 2
<b>C16:0</b>	Palmitat
<b>C18:0</b>	Estearat
<b>C18:1</b>	Oleat
<b>DOHaD</b>	Developmental Origins of Health and Disease
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EGIR</b>	European Group for the Study of Insulin Resistance
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

<b>Fabp</b>	Fatty Acid Binding Protein
<b>Fasn</b>	Fatty Acid Synthase
<b>fCE</b>	Colesterol lliure
<b>FOAD</b>	Fetal Origins of Adult Disease
<b>FPLC</b>	Fast Protein Liquid Chromatography
<b>F0</b>	Generació parental
<b>F1</b>	Descendència de la generació parental
<b>F2</b>	Descendència de la generació F1
<b>GC</b>	Gas Chromatography
<b>GLUT1</b>	Glucose Transporter 1
<b>GS</b>	Glycogen Sintase
<b>Gsk3</b>	Glycogen Synthase Kinase 3
<b>G6P</b>	Glucose 6-Phosphate
<b>G6Pase</b>	Glucose 6-Phosphatase
<b>HDL</b>	High Density Lipoprotein
<b>Hmgcr</b>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coa Reductase
<b>HNF4a</b>	Hepatocyte Nuclear Factor 4-alpha
<b>HOMA-b</b>	Homeostasis Model of Assessment – beta cell
<b>HOMA-IR</b>	Homeostasis Model of Assessment – Insulin Resistance
<b>IDF</b>	International Diabetes Federation
<b>IL6</b>	Interleucine-6
<b>IMC</b>	Índex de Massa Corporal
<b>Ins</b>	Insulina
<b>IpGTT</b>	Intraperitoneal Glucose Tolerance Test
<b>IpITT</b>	Intraperitoneal Insulin Tolerance Test
<b>IRS-1</b>	Insulin Receptor Substrate-1
<b>LBW</b>	Low Birth Weight
<b>LDL</b>	Low Density Lipoprotein
<b>LxRa</b>	Liver X Receptor alpha
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MCP1</b>	Monocyte Chemoattractant Protein-1
<b>MIDA</b>	Mass Isotopomer Distribution Analysis

<b>mRNA</b>	ARN missatger
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (oxidized)
<b>NADH</b>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (reduced)
<b>NaPyr</b>	Piruvat Sòdic
<b>NCEP</b>	National Cholesterol Education Program
<b>OMS</b>	Organització Mundial de la Salut
<b>ON</b>	Overnutrition
<b>ON -</b>	Sobrenutrit no estimulat
<b>ON +</b>	Sobrenutrit estimulat amb insulina
<b>PAI-1</b>	Plasminogen Activator Inhibitor-1
<b>pAkt</b>	Phosphoprotein Kinase B
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>Pck</b>	Phosphoenolpyruvate CarboxiKinase
<b>Pdk</b>	3-Phosphoinositide Dependent Kinase 1
<b>PCG1a</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma Coactivator Gene 1a
<b>pGsk3</b>	Phosphoglycogen Synthase Kinase 3
<b>PI3K</b>	Phosphatidil-Inositol 3-Phosphate
<b>PL</b>	Fosfolípids
<b>PPARα</b>	Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha
<b>PPARγ</b>	Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma
<b>qPCR</b>	Quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>RT</b>	Retrotranscription
<b>RxRa</b>	Retinoid X Receptor alpha
<b>Scd1</b>	Stearoyl-Coa Desaturase-1
<b>SDS</b>	Sequence Detection System
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis
<b>Srebp1</b>	Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1
<b>TAG</b>	Triglicèrids
<b>TBS-T</b>	Tris Buffered Saline – Tween
<b>TC</b>	Colesterol Total
<b>TCA</b>	Tricarboxylic Acid Cycle
<b>TNFα</b>	Tumor Necrosis Factor Alpha

**UMCG** University Medical Centre Groningen  
**VLDL** Very Low Density Lipoprotein

## **INTRODUCCIÓ**





# 1. SÍNDROME METABÒLICA

## 1.1 DEFINICIÓ

La Síndrome Metabòlica, també coneguda com a Síndrome Metabòlica X, Síndrome X, Síndrome de Resistència a la Insulina, Síndrome de Reaven i CHAOS (Austràlia), es caracteritza per la convergència de diversos factors de risc cardiovascular en un sol subjecte. Algunes de les característiques més comunes són l'obesitat abdominal, la Diabetis tipus 2, la resistència a la insulina i la hiperinsulinèmia.

Les primeres descripcions de l'associació entre la diabetis i diverses situacions clíniques daten de la dècada del 1920, encara que no va ser fins a finals de la dècada del 1970 que es va utilitzar el terme "Síndrome Metabòlica" de forma comú per descriure únicament els factors de risc associats amb la diabetis.

L'any 1988 Gerald Reaven va suggerir que aquests factors tenien tendència a trobar-se en un mateix individu, en forma d'una síndrome que va denominar "X", on la resistència a la insulina constituïa el mecanisme fisiopatològic bàsic (Reaven GM, 1988). Va proposar cinc conseqüències fonamentals, totes relacionades amb un major risc de malaltia coronària, cardiopatia isquèmica, disfunció ventricular esquerra i fallida cardíaca. Els components originals de la Síndrome X de Reaven eren:

- Resistència a la captació de glucosa mediada per insulina
- Intolerància a la glucosa
- Hiperinsulinèmia
- Augment de triglicèrids a les VLDL
- Disminució de colesterol tipus HDL
- Hipertensió arterial

Al llarg dels anys s'han anat afegint més components a la definició d'aquesta Síndrome (Zavaroni I, 1987), alhora que ha rebut les diferents denominacions.

El 1998 l'Organització Mundial de la Salut (OMS) va proposar la primera definició unificada per la Síndrome Metabòlica.

Una segona definició ve donada per l'European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) el 1999 que més que en la Síndrome Metabòlica, es centra en la Síndrome de la insulinoresistència (Luquez HA, 2004).

Actualment existeixen dues grans definicions per la Síndrome Metabòlica, proporcionades per la International Diabetes Federation (IDF) (que assumim al llarg d'aquest treball pel fet de ser més actual i d'àmbit internacional) i l'American Heart Association (AHA) (que ha millorat la definició proporcionada per la US National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP)).

Les definicions de l'IDF i l'AHA són molt semblants entre si, encara que es diferencien principalment en dos aspectes: 1) segons l'IDF, si l'IMC (índex de massa corporal) > 30 kg/m<sup>2</sup> es considera que hi ha obesitat central i no cal mesurar la circumferència de la cintura. No obstant això, aquest paràmetre exclou qualsevol subjecte sense increment de la circumferència de cintura si l'IMC<30, mentre que, en la definició de l'AHA, la síndrome metabòlica es pot diagnosticar amb base a altres criteris; 2) l'IDF utilitza punts de tall específics geogràficament per a la circumferència de la cintura, mentre que en la definició de l'AHA s'utilitza un conjunt de punts de tall per a la circumferència de la cintura, independentment de la geografia (Laaksonen DE, 2002; Scheen AJ; Batsis JA 2007).

Criteri	Definició			
	OMS 1998	EGIR 1999	IDF 2005	AHA 2005
Mesura de l'obesitat: circumferència de la cintura (cm)	Homes >90 Dones > 85 i/o IMC > 30 kg/ m <sup>2</sup>	Homes > 94 Dones > 80	Específica per cada ètnia (Batsis JA, 2007)	Homes > 102 Dones > 88
TAG (mmol/l)	≥ 1.7	≥ 2.0	> 1.7 o tractament específic per aquesta abnormalitat	≥ 1.7 o tractament per hipertriglicèridèmia (àcid nicotínic i fibrats)
HDL-CE (mmol/l)	Homes ≤ 0.9 Dones ≤ 1.0	< 1.0	Homes ≤ 1.03 Dones ≤ 1.3 o tractament específic per aquesta abnormalitat	Homes < 1.03 Dones < 1.3 o tractament per baix HDL-CE (àcid nicotínic i fibrats)
Pressió Sanguínia (mm Hg)	≥ 160 /90	≥ 140 /90 o tractament per hipertensió	Sistòlica ≥ 130 o diastòlica ? 85 o tractament previ	Sistòlica ≥ 135 o diastòlica > 85 o tractament amb antihipertensius
Glucosa dejú (sèrum) (mmol/l)	≥ 7.0	≥ 6.1 (únicament no diabètics)	≥ 5.6 o diabetis diagnosticada	≥ 5.6 o tractament per glucèmia elevada
Resistència a la insulina	Captació de glucosa per sota del primer quartil de les dades resultants de la població general	Requereix hiperinsulinèmia en dejú	-	No necessari
Proteinúria	Microalbuminúria > 20 ug/min Índex albúmina/creatinina ? 20 mg/gr	-	-	-
Núm. de criteris requerits	Intolerància a la glucosa o diabetes + dos de les següents: pressió sanguínia, dislipèmia (TAG o HDL-CE), obesitat, proteinúria	Resistència a la insulina + dos de les següents: hipertriglicèmia, hipertensió, dislipèmia (TAG o HDL-CE) i obesitat central	Obesitat central + dos criteris dels indicats	Tres criteris entre qualsevol dels indicats

**Figura 1. Principals definicions de la Síndrome Metabòlica.** OMS, Organització Mundial de la Salut. EGIR, European Group for Insulin Resistance. IDF, International Diabetes Federation. AHA, American Heart Association. TAG, Triglicèrids, HDL-CE, Colesterol HDL. [Taula adaptada de Batsis JA, 2007]

La Síndrome Metabòlica ha assolit proporcions epidèmiques a nivell mundial, i això suposa un greu problema de salut pública amb importants implicacions econòmiques. La prevalença de la Síndrome Metabòlica es troba en creixement continu i afecta poblacions arreu del món independentment de la seva localització geogràfica, sexe i edat (Batsis JA, 2007).

La prevalença mundial de la Síndrome Metabòlica és del 20-30%, en un context on el sobrepès infantil és del 12% i la població obesa assoleix xifres del 29% (Cornier MA, 2008; Grundy SM 2007; Alsaraj F, 2009; Eckel RH, 2010). Aquest augment en la prevalença de l'obesitat (BMI>30kg/m<sup>2</sup>) està associat amb un augment en comorbiditats associades com per exemple Diabetis tipus 2, elevada pressió sanguínia i malaltia coronària isquèmica (Mc Millen, 2005).

Donat l'estret lligam que existeix entre la Diabetis tipus 2 i la Síndrome Metabòlica, l'epidemiologia sobre la diabetis és un factor a tenir en compte. La prevalença de la Diabetis tipus 2 l'any 2011 era del 7% sobre la població global ([www.idf.org/diabetes-atlas](http://www.idf.org/diabetes-atlas) 2012). La projecció és que l'augment en la prevalença de la Diabetis tipus 2 en els països desenvolupats serà d'un 42% (de 51 milions a 72 milions de persones afectades) l'any 2027, mentre que en els països subdesenvolupats l'augment esperat és del 170%. És a dir, es passarà de 84 milions a 228 milions de persones que desenvoluparan diabetis al llarg de les properes dues dècades (Herman WH, 2007).

Donat que la Síndrome Metabòlica duplica el risc de patir una malaltia cardiovascular (quan es compara amb la població sense la Síndrome), es considera que és la responsable de més de la meitat de les malalties cardiovasculars diagnosticades. Aquests valors incrementen quan es té en compte que la Síndrome Metabòlica també s'associa amb el risc de patir diabetis tipus 2, que per si mateixa ja implica un augment del risc de patir la Síndrome (Grundy SM, 2008).

Existeixen factors genètics que es veuen potenciats pels factors adquirits. La genètica de la Síndrome Metabòlica és complexa. Es coneixen 44 *loci* associats amb l'obesitat en estudis genòmics i de lligament. Les regions 3p, 15p i 18q estan relacionades amb l'obesitat i la diabetis. També la regió 7q, on es localitza el gen de la leptina, sembla estar associada amb la hiperinsulinèmia, la hipertensió i l'obesitat (Laclaustra Gimeno M, 2005).

L'augment ràpid de la prevalença dels desordres característics de la Síndrome Metabòlica suggereix que l'ambient i els hàbits, més que la genètica, poden tenir una influència important en aquesta epidèmia (Patel MS, 2009; Wang X, 2013).

## 1.2 MECANISMES FISIOPATOLÒGICS

En la fisiopatologia de la Síndrome Metabòlica existeix un vincle entre totes les alteracions, que sovint s'atribueix a la resistència a la insulina, afavorida per l'augment d'àcids grassos lliures relacionat amb el sobrepès. Aquest estat provoca trastorns en la utilització de glucosa cel·lular i producció hepàtica de glucosa. El metabolisme lipídic presenta també les conseqüències de la resistència a la insulina, que donen lloc a hipertrigliceridèmia i hipocolesterolèmia HDL (característiques de la Síndrome Metabòlica). La hipertensió es relaciona amb alteracions de la via de la insulina i la regulació del sistema nerviós vegetatiu. A més, últimament s'ha relacionat la Síndrome Metabòlica i la resistència a la insulina amb el desenvolupament d'aterosclerosi i altres malalties, com el fetge gras no alcohòlic i la Síndrome d'ovari poliquístic (Laclaustra Gimeno M, 2005).

### 1.2.1 RESISTÈNCIA A LA INSULINA

La resistència a la insulina es defineix com un defecte en l'acció de la insulina que provoca un augment de la insulina basal per mantenir la glucèmia en un rang normal. En termes fisiològics es refereix a una inadequada captació de la glucosa depenent d'insulina per part dels teixits, en especial del fetge, múscul i teixit adipós.

Els mecanismes moleculars de la resistència a la insulina abarquen diverses i complexes alteracions en la senyalització de la insulina. A més, la regulació normal de l'expressió i síntesi d'adipoquines té un efecte important en la sensibilitat a la insulina (Zamora-Valdés D, 2004).

#### *a) Senyalització de la insulina*

La via de la Fosfatidil-Inositol-3 Kinasa (PI3K) és el principal mecanisme pel qual la insulina exerceix les seves funcions en el metabolisme de la glucosa i els lípids. L'altra via principal de transducció de la senyalització per insulina, és la via de les MAP kinases (MAPk) que intervé en la regulació de la síntesi de proteïnes i enzims que regulen principalment el metabolisme energètic.

En la via de la PI3K la insulina circulant s'uneix al seu receptor, que es fosforila i fa que s'incorpori fosfat a un altra molècula anomenada IRS-1 (substrat del receptor d'insulina). El IRS-1 fosforilat, s'uneix a la vegada a varies proteïnes anomenades SH2. Una de les proteïnes SH2 és la Fosfatidil-Inositol-3 Kinasa (PI3K), a la qual fosforila i es forma el complex [IRS-1 PI3K]. Un dels efectors és Akt, que és reclutat a la membrana, i juntament amb la proteïna kinasa 1 depenent de 3-fosfoinosítid (PDK1), es fosforila i s'activa. L'activació d'Akt produeix el seu efecte en diferents proteïnes de la via. Una d'aquestes proteïnes és Gsk3, que en la seva forma no fosforilada inhibeix la síntesi de glicogen. La fosforilació de Gsk3 per part de pAkt inhibeix la seva funció, de manera que té lloc la síntesi de glicogen (Hooper C, www.abcam.com).

La insulina augmenta la captació de glucosa al múscul i teixit adipós, inhibeix la producció hepàtica de glucosa. Estimula la glucòlisi, la lipogènesi, la glucogènesi i la síntesi de proteïnes, i inhibeix la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos, la glicogenolisi i la proteòlisi (Zamora-Valdés D, 2004).

Per tant, la resistència a insulina sotmet als teixits a una inadequada acció lipogènica, afavoreix la obesitat abdominal, la producció a nivell hepàtic de triglicèrids, l'alliberació de VLDL i conseqüentment el desenvolupament de dislipidèmia.

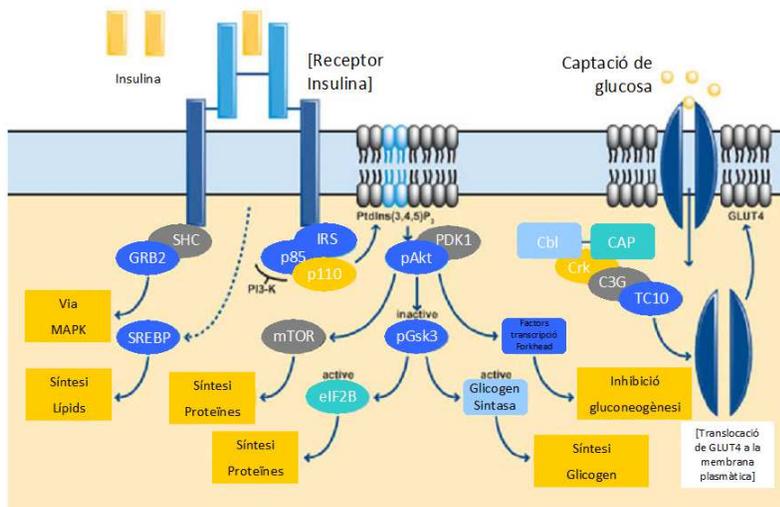


Figura 2. Via de senyalització de la insulina. [Figura adaptada de Hooper C, Abcam].

### b) Adipoquines i sensibilitat a insulina

Les adipoquines són el conjunt de proteïnes produïdes pel teixit adipós. Entre elles destaquen  $TNF\alpha$ , IL-6, la resistina, la leptina i l'adiponectina, que afecten la sensibilitat a la insulina, així com l'angiotensinogen i l'inhibidor de l'activador de plasminogen (PAI-1) que tenen efecte sobre la vascularització.

$TNF\alpha$  és reconegut com un mitjancer important de resistència a la insulina en obesitat. S'expressa principalment en macròfags i limfòcits. Els adipòcits expressen tant  $TNF\alpha$  com el seu receptor. En estats d'obesitat, l'expressió de ARNm de  $TNF\alpha$  està augmentada en teixit adipós. En canvi, els nivells sèrics són normals. L'elevació local de  $TNF\alpha$  es relaciona amb el nivell d'hiperinsulinèmia (Zamora-Valdés D, 2004).

IL-6 és secretada per cèl·lules del sistema immune, fibroblasts, cèl·lules endotelials, múscul esquelètic, nuclis hipotalàmics i teixit adipós. L'expressió de IL-6 pel teixit adipós està augmentada en estadis de resistència a la insulina, a més, els seus nivells sèrics correlacionen amb la hiperinsulinèmia, són predictors del desenvolupament de diabetis tipus 2 i disminueixen amb la reducció de pes (Zamora-Valdés D, 2004). IL-6 inhibeix la senyalització de la insulina en fetge de ratolí i és capaç d'augmentar els nivells circulants d'àcids grassos (Pittas AG, 2004).

La resistina és una hormona relativament recent descoberta (l'any 2001). Secretada exclusivament pel teixit adipós, es coneix que circula en sèrum i els seus nivells es troben augmentats en obesitat i estadis de resistència a la insulina. Encara no es coneixen els

mecanismes de senyalització de la resistina ni les seves funcions. El que sí que es coneix és que bloqueja la senyalització de la insulina en els principals teixits diana per la insulina (teixit adipós, fetge i múscul).

La leptina és secretada pel teixit adipós en proporció al greix corporal. Inhibeix la ingesta d'aliments quan la demanda calòrica és suficient i activa la termogènesi. Estudis *in vitro* demostren que podria tenir efectes reguladors directes sobre la senyalització de la insulina (Cohen B, 1996). Així mateix, individus obesos tenen concentracions plasmàtiques altes de leptina (Zamora-Valdés D, 2004).

L'adiponectina s'expressa més en teixit adipós subcutani que en teixit adipós visceral. Té propietats antidiabètiques, antiinflamatòries i antiaterogèniques. Es coneix que inhibeix la lipogènesi i produeix un augment de l'oxidació d'àcids grassos. Els seus nivells plasmàtics guarden una forta relació inversa amb el pes corporal i una forta relació directa amb la sensibilitat a la insulina, servint així com a indicadors de resistència a la insulina (Zamora-Valdés D, 2004; Martin-Groner MS, 2012).

## 1.2.2 OBESITAT

Existeix una estreta correlació entre la obesitat abdominal i els factors de risc que defineixen la Síndrome Metabòlica, especialment la hipertrigliceridèmia, així com entre la obesitat i la resistència a la insulina (Okosun IS, 2000).

La tendència fisiològica és l'emmagatzematge de triglicèrids en adipòcits petits perifèrics. Quan la capacitat d'aquestes cèl·lules es sobrepassa, es produeix un augment del flux d'àcids grassos lliures cap a la circulació esplàcnica, que redueix la utilització de glucosa pel múscul esquelètic, estimula la producció hepàtica de lipoproteïnes de molt baixa densitat i glucosa, i potencia la secreció aguda d'insulina estimulada per la glucosa. L'efecte lipotòxic a les cèl·lules  $\beta$  del pàncrees per part dels àcids grassos lliures a llarg termini podria ser part del nexa entre la obesitat, la resistència a la insulina i el desenvolupament de diabetis tipus 2 (Miranda PJ, 2005; Alegria E, 2008).

També s'ha comprovat que el dipòsit patològic pot realitzar-se en adipòcits perifèrics anormalment grans, tal i com es demostra en un estudi realitzat en indis pima. L'efecte de la mida de l'adipòcit en el risc a desenvolupar diabetis sembla ser independent i additiu a l'efecte de la insulinoresistència (Weyer C, 2000).

En els primers estadis de l'obesitat es produeix un increment de la massa de cèl·lula beta per compensar la resistència perifèrica a la insulina, però si la obesitat persisteix, la hipertròfia de la cèl·lula  $\beta$  esdevé en una fallida i l'acció secretora compensatòria resulta inadequada. L'obesitat s'associa molt sovint amb l'augment crònic dels nivells d'àcids grassos, intolerància a la glucosa, hiperlipèmia i hiperglucèmia, que eventualment contribueix a la disfunció de la cèl·lula  $\beta$  i una disminució de la seva massa que caracteritza l'aparició de Diabetis tipus 2 en pacients obesos (McMillen C, 2005).

### 1.2.3. DISLIPÈMIA

Els cinc principals components de la dislipèmia associats amb la Síndrome Metabòlica són:

- a) augment del flux d'àcids grassos lliures
- b) augment dels triglicèrids
- c) augment de lipoproteïnes de baixa densitat (LDL)
- d) disminució de lipoproteïnes d'alta densitat (HDL)
- e) lipèmia postprandial

La dislipèmia en la Síndrome Metabòlica és causada per la combinació dels diferents components descrits prèviament, pot tenir un efecte en el metabolisme general i s'ha establert com un important factor de risc de malalties cardiovasculars.

#### a) *Augment del flux d'àcids grassos lliures*

Probablement el defecte primari és la incapacitat del teixit adipós d'incorporar els àcids grassos lliures a triglicèrids (esterificació inadequada). La resistència a la insulina també provoca una reducció en la retenció dels àcids grassos lliures en els adipòcits. Aquestes dos anomalies donen lloc a un increment del flux d'àcids grassos lliures cap al fetge.

#### b) *Augment de triglicèrids*

L'augment del flux d'àcids grassos lliures des de la perifèria cap al fetge, estimula la síntesi hepàtica de triglicèrids, que a la vegada promou l'ensamblatge i secreció de VLDL que contenen triglicèrids, així com la producció d'Apo B al fetge.

La insulina suprimeix la formació de grans partícules de VLDL. Quan la resistència a la insulina es produeix, es desencadenen els següents dos esdeveniments:

- l'adipòcit visceral és més sensible als efectes metabòlics de les hormones lipídiques i s'alliberen més àcids lliures al sistema portal, que serveixen com a substrat hepàtic per a triglicèrids i VLDL riques en triglicèrids.
- augmenta la producció d'Apo B, i com a conseqüència augmenta la síntesi i secreció de VLDL.

#### c) *Augment de lipoproteïnes de baixa densitat*

En condicions de hipertrigliceridèmia, augmenta el nombre de VLDL riques en triglicèrids. Canvis conformacionals en la proteïna Apo B fan que les VLDL no es puguin unir eficientment als receptors de LDL i per tant allarguin el temps d'estada a la circulació.



Les proteïnes de transferència d'èsters de colesterol substitueixen èsters de colesterol per triglicèrids en LDL i HDL. Les LDL riques en triglicèrids són un bon substrat per la lipasa hepàtica, que finalment genera LDL de petita densitat, que s'associen amb un increment del risc cardiovascular.

*d) Disminució de lipoproteïnes d'alta densitat (HDL)*

Sovint el colesterol HDL baix és considerat un efecte secundari de l'augment de triglicèrids de plasma, que indueix la proteïna de transferència dels èsters de colesterol a intercanviar triglicèrids per èsters de colesterol a les partícules de LDL i HDL. Es formen partícules HDL riques en triglicèrids i pobres en colesterol, que són més propenses a ser catabolitzades. Aquest mecanisme contribueix als baixos nivells de HDL.

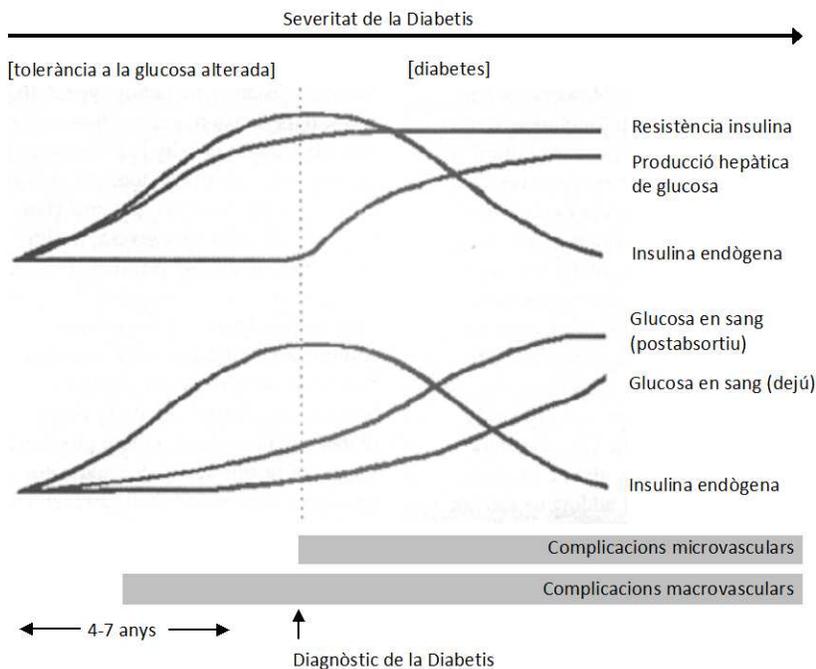
*e) Lipèmia postprandial*

En condicions de resistència a la insulina, els àcids grassos lliures en estat postprandial augmenten de forma progressiva. Els quilomicrons són la principal lipoproteïna postprandial. La resistència a la insulina té dos efectes potencials en el metabolisme dels quilomicrons. En primer lloc regula a la baixa l'expressió del receptor de LDL, i en segon lloc incrementa la síntesi de colesterol hepàtica i la secreció de VLDL. Aquests efectes incrementen la competència entre els quilomicrons i els remanents de VLDL pels receptors hepàtics, que en última instància dificulta l'absorció de quilomicrons per aquesta via.

(Ruotolo G 2002)

#### 1.2.4. INTOLERÀNCIA GLUCOSA

La intolerància a la glucosa és una forma de prediabetis on l'individu té valors elevats de glucosa postprandial en sang sense arribar als valors d'una diabetis tipus 2. Pel diagnòstic d'intolerància a la glucosa, l'ADA recomana uns nivells de glucosa en dejú entre 100 i 125 mg/dl i glucosa postprandial 140 mg/dl (2h després d'una ingesta de 75g de glucosa via oral) però sense arribar a 200 mg/dl.



**Figura 3. Història natural de la resistència a la insulina.** Progressió des de l'alteració de la tolerància a la glucosa fins la Diabetis tipus 2. [Figura adaptada de Ramlo-Halsted BA, 2000]

### 1.2.5. DIABETIS TIPUS 2

La Diabetis tipus 2 apareix quan la secreció per part de la cèl·lula  $\beta$  no permet compensar la resistència a la insulina.

La cèl·lula  $\beta$  és una de les primeres dianes de la programació metabòlica ja que part seu del desenvolupament es dona al pàncrees perinatal i depèn de tres processos: neogènesi de les cèl·lules endocrines de l'epiteli del ducte pancreàtic, proliferació de les cèl·lules endocrines a la diferenciació endocrina i proliferació de les cèl·lules endocrines en els illots en desenvolupament (McMillen C, 2005). Per això, alteracions durant l'etapa perinatal, on té lloc la proliferació de la cèl·lula beta, poden esdevenir el primer pas en l'aparició de diabetis en l'edat adulta.

D'altra banda, la fisiopatologia del desenvolupament de la Diabetis tipus 2 és complexa, multifactorial, i es desenvolupa durant un període de temps prolongat. Primer es fa visible la resistència a l'acció de la insulina. La hiperglucèmia té lloc després que la secreció pancreàtica de la insulina esdevingui incapaç de proveir la suficient insulina per les

necessitats metabòliques del cos. Sembla, que en cert punt la pèrdua de control de la glucosa en sang comença a resultar en una intolerància a la glucosa dietètica que finalment esdevé en diabetis.

Els vincles entre la Síndrome Metabòlica i la Diabetis tipus 2 són més forts que els que existeixen en el cas de malalties cardiovasculars. Moltes persones que tenen la Síndrome metabòlica ja tenen Diabetis tipus 2. Pels qui ja tenen la Síndrome però no tenen diabetis, el risc de desenvolupar Diabetis tipus 2 és especialment alt (Shaw J, 2006).

## 2. ORIGEN DURANT EL DESENVOLUPAMENT DE MALALTIES DE L'ADULT

### Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)

La hipòtesi de l'Origen Durant el Desenvolupament de Malalties de l'Adult (Developmental Origins of Health and Disease, DOHaD) proposa que les condicions ambientals durant el desenvolupament fetal i postnatal influeixen la salut en l'edat adulta i tenen efectes permanents sobre el creixement i el metabolisme. És el que s'anomena programació (Lucas A, 1991; Gluckman P, 2007; Wang X, 2013).

L'objectiu principal de DOHaD ha esdevingut estudiar la relació que existeix entre canvis durant el desenvolupament i l'aparició de malalties cròniques en l'edat adulta (diabetis tipus 2, Síndrome Metabòlica, esquizofrènia, osteoporosi, etc.). La recerca de DOHaD abasteix múltiples disciplines, incloent medicina, antropologia i salut pública.

El 1980, David Barker va definir una relació entre el baix pes al néixer (*low birthweight*, LBW) i la malaltia isquèmica en l'adult. La relació entre el baix pes al néixer i la malaltia en l'adult va esdevenir la Hipòtesi de Barker, que afirma que el baix pes al néixer i un augment de la mida del cap eren indicadors d'una nutrició pobre o una aportació insuficient d'oxigen durant diversos estats de l'embaràs. La recerca encapçalada per Barker va concloure cap als anys noranta amb la demostració de l'associació de la relació entre l'ambient prenatal i el risc de patir malalties en l'edat adulta (Barker DJ, 2004; Wadhwa PD, 2009).

Posteriorment, aquesta idea va donar lloc al paradigma de l'Origen durant el Desenvolupament de la Salut i la Malaltia (Developmental Origins of Health and Disease, DOHaD), que emfatitza el rol tant de l'ambient prenatal com postnatal en el desenvolupament, que pot influenciar la salut al llarg de la vida. Aquesta idea va arrelar força en la teoria de la història de la vida, que proposa que un organisme ha de ser capaç de desenvolupar mecanismes adaptatius per tal de sobreviure en condicions subòptimes. Aquests canvis adaptatius poden ser immediats, per tal de sobreviure a curt termini i permetre la reproducció de l'organisme, però alhora poden suposar un cost en la salut a llarg termini augmentant el risc de patir malalties cròniques (per exemple Síndrome Metabòlica, Diabetis tipus 2, hipertensió, malalties cardiovasculars, esquizofrènia, osteoporosi, sobrepès, obesitat, asma, etc.) (McMillen C, 2005; Gluckman PD, 2007).

El paradigma de DOHaD, estudiat al llarg dels últims vint-i-cinc anys, reflexa idees que han estat debatudes en el camp de la genètica des de fa molts anys. El genetista James Neel (1962) va suggerir la hipòtesi del genotip estalviador (*thrifty genotype hypothesis*) com a resposta a l'elevada taxa de diabetis observada en certs grups de població. Ell proposava els

gens com a principals responsables d'aquest fenomen. Com a retret d'aquesta idea, Hales i Barker van proposar la hipòtesi del fenotip estalviador (*thrifty phenotype hypothesis*), emfatitzant la importància de la plasticitat del desenvolupament en la variabilitat fenotípica. En última instància, aquesta hipòtesi reconeix una interacció entre l'ambient i els gens, que té implicacions en la salut en l'edat adulta (McMillen C, 2005; Hu FB, 2011).

Un gran nombre d'estudis epidemiològics realitzats en humans, així com estudis experimentals en animals demostren que l'ambient, i en particular la nutrició, té un paper clau durant estadis primerencs del desenvolupament, contribuint a l'aparició de la síndrome metabòlica en l'etapa adulta (Langley-Evans SC, 2006; Neu J, 2007; Patel MS 2010 Jimenez-Chillaron, 2012; Wang X, 2013; Li G, 2013).

Koletzko et al. van demostrar que una dieta rica en proteïna s'associa amb un increment de pes en els primers anys de vida (Koletzko B, 2009). Així mateix, un augment de la ingesta proteica durant la infància es relaciona amb una composició corporal desfavorable en l'adolescència (Singhal A, 2010). A més, el creixement durant l'etapa postnatal més primerenca s'associa amb alteracions de la pressió sanguínia i obesitat (Tzoulaki I, 2010). És important destacar que s'ha demostrat que la prevenció del sobrepès i/o obesitat durant la infància pot revertir els efectes adversos en l'edat adulta (Juonala M, 2011).

Diversos models animals donen suport a les observacions dels estudis epidemiològics. Un augment de la nutrició durant l'etapa postnatal té conseqüències permanents en la salut (Martin-Gronert MS, 2013). Així mateix, rosegadors exposats a sobrenutrició postnatal mostren un augment de pes i de l'adipositat al deslletament, i esdevenen resistents a insulina en l'edat adulta. En part, aquests efectes són mediat per resistència hipotalàmica (Davidowa H, 2007; Plagemann A, 1999; Li G, 2013). A més, s'ha descrit que la sobrenutrició en ratolins durant etapes primerenques de la vida augmenta l'estrès oxidatiu i modifica la funció cardiovascular (Renovato M, 2008; Habbout A, 2013).

En resum, es coneix que durant l'etapa postnatal la interrelació entre la nutrició, el patró de creixement i el metabolisme és crucial alhora de determinar la salut al llarg de la vida (Neu J, 2007). Tot i això, els mecanismes responsables de la programació primerenca del fenotip encara són força desconeguts.

### 3. HERÈNCIA TRANSGENERACIONAL: EPIGENÈTICA

S'ha proposat que un mecanisme general a través del qual determinades exposicions durant l'etapa perinatal es relacionen amb canvis fenotípics en l'etapa adulta és l'alteració dels patrons epigenètics, que s'encarreguen de manifestar la informació emmagatzemada en el genoma (Gluckman PD, 2004; Gluckman PD, 2007; Jirtle RL, 2007).

El terme "epigenètica" s'utilitza per fer referència, a l'estudi de la regulació heretable de l'expressió gènica sense canvis en la seqüència de nucleòtids (Berger SL, 2009).

Dos dels fenòmens epigenètics més estudiats en mamífers són la inactivació del cromosoma X i l'impronta genòmica. La regulació epigenètica també es troba implicada en l'expressió gènica específica de teixit i en el silenciament d'elements repetitius (transposables), inhibint la seva replicació i transposició, i per tant prevenint la seva mutagènesi insercional (Jirtle RL, 2007).

La regulació epigenètica es pot donar per canvis en la conformació de la cromatina segons la interacció d'aquesta amb les histones. Es tracta d'un nivell clau de regulació, ja que l'estat en el que es trobi la cromatina determina el moment, el lloc i la forma en què un gen s'expressa. Si la cromatina es troba condensada, els elements de transcripció no poden accedir a l'ADN, i per tant, el gen no es transcriu; és a dir, es troba silenciada. Per contra, si la cromatina no es troba condensada, els activadors de la transcripció es poden unir a les regions promotores perquè pugui tenir lloc la transcripció del gen. Aquesta és una de les formes de regulació del genoma.

Existeixen tres processos epigenètics de regulació del genoma:

- metilació de l'ADN
- modificació de les histones
- ARN no codificants

En general, la metilació de l'ADN està implicada en el silenciament de gens a llarg termini, mentre que la modificació d'histones té un efecte més flexible i a curt termini. Tot i això, existeix una interrelació entre mecanismes.

També existeix una certa interacció entre mecanismes genètics, no genètics i epigenètics. Per exemple, un polimorfisme (factor genètic) que introdueixi una possible diana de metilació de l'ADN (factor epigenètic), un dinucleòtid CG, o un lloc d'unió d'un factor de transcripció al promotor de NDUFB6, s'associa a un augment de metilació de l'ADN, una disminució de la seva expressió gènica i conseqüentment una disminució de l'activitat metabòlica amb l'edat (factor no genètic) (Ling C, 2009).

### 3.1 HERÈNCIA EPIGENÈTICA

Els canvis epigenètics poden ser heretats en cèl·lules somàtiques, proporcionant així un mecanisme a través del qual l'ambient afecta l'epigenoma a llarg termini. L'alteració dels patrons epigenètics pot augmentar el risc de desenvolupar malalties (Gluckman PD, 2009). Nombrosos estudis realitzats en animals i humans suporten aquesta hipòtesi en el context DOHaD (Jirtle RL, 2007).

A més, l'herència epigenètica té lloc si l'alteració en l'epigenoma es produeix en cèl·lules de la línia germinal. Hi ha evidències de que algunes modificacions epigenètiques poden mantenir-se estables durant la meiosi i les primeres divisions del zigot i transferir-se a la següent generació filial. Així doncs, en l'herència transgeneracional es dona la transmissió d'un tret biològic (fenotip) a les següents generacions a través de la línia germinal.

### 3.2 INFLUÈNCIA AMBIENTAL

Les perturbacions ambientals poden produir modificacions epigenètiques, i per tant, promoure canvis en l'expressió gènica. Fins al moment, s'ha descrit aquest efecte en tres tipus de dianes genòmiques: gens "housekeeping", elements transposables propers a gens amb epial·lels "metastables" i elements reguladors de gens improntats. Es tracta de dianes genòmiques que contenen regions riques en illes CpG (regions amb alta concentració de citosina i guanina), que es poden trobar metilades o desmetilades respecte l'estat normal de metilació (Jirtle RL, 2007).

Així doncs, factors ambientals poden modificar l'epigenoma, i aquests canvis poden ser heretats de forma transgeneracional afectant de forma potencial la salut de les generacions futures (Gluckman PD, 2004; Pembrey ME, 2006; Jirtle RL, 2007; Burdge GC, 2010).

Durant la gametogènesi (diferenciació de les cèl·lules germinals en l'adult), les cèl·lules germinals perden la metilació de l'ADN abans de migrar cap a les crestes genitals, on s'establiran de nou els patrons de metilació (abans del naixement en cèl·lules germinals masculines i després del naixement en cèl·lules germinals femenines) (Song F, 2009; Gluckman PD, 2009). L'herència d'un fenotip modificat per factors ambientals té lloc durant la gametogènesi. La reprogramació epigenètica de la línia germinal té lloc durant la gametogènesi, encara que els mecanismes a través dels quals té lloc es desconeixen (Jirtle RL, 2007; Gluckman PD, 2009). L'efecte global de la desmetilació del genoma és produir cèl·lules pluripotents on tots els gens siguin potencialment actius a nivell de transcripció. La pèrdua de pluripotència, la diferenciació cel·lular i la maduració funcional del teixit depenen dels canvis en l'estat de metilació dels promotors dels gens en els diferents estadis del desenvolupament (Burdge GC, 2010).

En termes generals, la transmissió de la informació de l'ambient a la següent generació a través de la línia germinal femenina, pot tenir lloc a través de la placenta o dels cromosomes de l'òvul. En canvi, en la línia germinal masculina, la informació ancestral és transmet a través dels cromosomes l'esperma (Pembrey ME, 2006; Jirtle RL, 2007).

## **HIPÒTESI I OBJECTIUS**





La nutrició durant les primeres etapes de la vida és un factor clau en la programació del metabolisme adult. Alteracions nutricionals durant l'etapa postnatal determinen el desenvolupament de trets característics de la Síndrome Metabòlica, no tan sols en l'adult, sinó també en la seva descendència.

Amb l'objectiu principal d'aprofundir en el coneixement de l'origen neonatal de la Síndrome Metabòlica en l'adult, aquesta tesi té com a objectius específics:

1. Desenvolupar i caracteritzar un model animal de sobrenutrició neonatal que desenvolupi la Síndrome Metabòlica en l'adult.
2. Estudiar els mecanismes moleculars subjacents a l'associació entre la sobrenutrició neonatal i la Síndrome Metabòlica en l'adult.
3. Avaluar l'herència transgeneracional del fenotip.



## **MATERIALS I MÈTODES**



# 1. MODEL ANIMAL I EXPERIMENTS *IN VIVO*

## 1.1 MODEL ANIMAL ON

L'espècie animal utilitzada per generar el model de treball és *Mus musculus*, de la soca ICR (CD1) adquirits a Harlan Laboratories (Itàlia) i mantinguts a les instal·lacions de l'estabulari de l'Hospital de Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona. Seguint les condicions d'estabulació del servei, els ratolins segueixen un cicle de 12h de llum-fosc a una temperatura constant de 22 °C i s'alimenten amb una dieta murina estàndard (2014 Tekland Global, Harlan Iberica, Barcelona, Spain). L'accés al menjar i l'aigua és lliure, excepte en els protocols que requereixen dejú. Tots els protocols aplicats han estat aprovats prèviament pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona (CEEA).

Es creuen ratolines verges de 2 mesos d'edat de la soca ICR amb mascles verges de la mateixa soca i edat. Al part, s'ajusta el nombre de cries /mare a 8 en els grups control (C) i 4 en els grups de sobrenutrició (ON). Les cries d'ambdós grups són alletades lliurement per la mare i constitueixen la generació parental F0.

A les 3 setmanes de vida es realitza el deslletament, de manera que tant les cries del grup control (C) com el grup de sobrenutrició (ON) són apartades de la mare i redistribuïdes en grups de 6 animals /gàbia.

Els mascles dels grups C-F0 i ON-F0 es creuen, als 2 mesos de vida, amb noves femelles verges per donar lloc a la generació F1. Al part, les ventrades d'ambdós grups s'ajusten a 8 cries /mare. És a dir, contràriament al que passa a la generació parental F0, els mascles del grup ON-F1 no són exposats a sobrenutrició.

La generació F2 s'obté seguint el mateix protocol, utilitzant mascles de la generació F1.

Els estudis es duen a terme en mascles d'edats compreses entre els 8 dies i els 4 mesos d'edat.

## 1.2 MESURA DE LA INGESTA

En animals de 4 dies de vida, la separació de les cries de la mare durant 1 hora permet aconseguir una situació basal del seu pes. Durant aquest període, es manté la temperatura dels animals amb l'ajuda d'una manta tèrmica. A continuació els animals són pesats (P0), reintroduïts a la mare i alletats lliurement. Al cap de 1 h d'haver estat reintroduïts es torna a mesurar el pes (P1). El càlcul de la ingesta es du a terme a través de la diferència de pes (P1-P0) en aquest interval d'una hora.

Als 4 mesos de vida, el càlcul de la ingesta és fa a través del guany de pes en un interval de temps. Els animals són exposats a un dejú previ de 4 h abans de prendre la mesura basal del pes.

### 1.3 TRACTAMENT AMB 13C-ACETAT

El tractament amb 13C-Acetata permet la incorporació de 13C marcat a l'organisme dels animals per analitzar la incorporació a àcids grassos.

Al dia postnatal 21 i durant 96 h, s'afegeix 10 mg [1-13C]-Acetata (Isotec, Miamisburg, OH) /gr d'aigua tant en el grup C com ON. Part d'ambdues cohorts s'estableix com control negatiu, és a dir, no reben [1-13C]-Acetata. L'accés a l'aigua és lliure per tots els grups.

Es recull una gota de sang de la cua en paper de filtre cada 12 h, és a dir, a temps 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 i 96 h. Així mateix, a temps 0 i 96 h es mesura el pes, la glucèmia i es recull sèrum. Finalment, el sacrifici té lloc en condicions de dejú (12-16 h), i s'extreu sèrum i teixits (fetge, teixit adipós i múscul).

### 1.4 TEST FISIOLÒGICS

#### 1.4.1 TEST DE TOLERÀNCIA INTRAPERITONEAL A LA GLUCOSA (ipGTT)

Aquest test s'utilitza per analitzar la capacitat de captació i metabolització de la glucosa. En resposta a un bolus de glucosa, un animal sa recupera els nivells basals de glucosa circulant en dues hores.

El test es realitza en animals prèviament dejunats 12 h. Després de fer una lectura basal dels nivells de glucosa circulant, així com una extracció prèvia de sèrum (condició dejú), es realitza una injecció intraperitoneal de 2 gr de glucosa /kg de pes corporal (Glucocemin 33%, B.Braun). A continuació es prenen lectures dels nivells de glucosa a temps 15, 30, 60, 90 i 120 min. A temps 30 min es repeteix l'extracció de sèrum.

La sensibilitat de la insulina es mesura a través de l'índex HOMA-IR, que utilitza els valors de glucosa (mg/dl) i insulina ( $\mu$ U/ml) en sèrum en condicions de dejú, seguint el model matemàtic  $HOMA-IR = Glucose \times Insulin / 405$ . Així mateix, pel càlcul de la secreció d'insulina s'utilitza la relació  $\Delta Insulin_{30-0 \text{ min}} / \Delta Glucose_{30-0 \text{ min}}$ , on els valors d'insulina i glucosa s'obtenen de les mostres de sèrum de l'ipGTT.

#### 1.4.2 TEST DE TOLERÀNCIA INTRAPERITONEAL A LA INSULINA (ipITT)

Aquest test indica la capacitat que tenen els teixits sensibles a la insulina de captar glucosa en resposta a un bolus d'insulina. En un animal sa, els nivells de glucosa disminueixen en resposta a la insulina de forma més sostenible que en un animal que presenta resistència a la insulina o diabetis.

El test es realitza en animals prèviament dejunats 4 h. Aquest dejuni permet normalitzar els nivells de glucosa fins nivells basals que alhora evitin hipoglucèmia en resposta a l'administració d'un bolus d'insulina. Es realitza una lectura dels nivells basals de glucosa

circulant. A continuació s'injecta de forma intraperitoneal, 1 U /animal de insulina (Insulina Lispro, Humalog®, Lilly) prèviament diluïda 1:500 en salí fisiològic. Es prenen lectures dels nivells de glucosa a temps 15, 30, 60, 90 i 120 min.

### 1.4.3 TEST DE PRODUCCIÓ DE GLUCOSA A PARTIR DE PIRUVAT

L'objectiu d'aquest test és l'estudi de la capacitat gluconeogènica. Es realitza en animals dejunats 12 h, i consisteix en la injecció intraperitoneal de 2 gr de piruvat (NaPyr, Sigma) /kg de pes corporal, diluït al 33% p/v en PBS. A més de una mesura de glucèmia a temps 0 (mesura basal), es prenen mesures a temps 15, 30, 60, 90 i 120 min.

### 1.4.4 TEST DE SÍNTESI DE LIPOPROTEÏNES

El Tyloxapol és una substància que bloqueja l'activitat lipolítica inhibint la lipoproteïna lipasa. L'augment de triglicèrids durant un interval de temps posterior a l'administració de Tyloxapol correspon a lipoproteïnes de nova síntesi. S'ha utilitzat doncs, per estudiar la producció de lipoproteïnes al llarg del temps.

L'assaig s'ha dut a terme en animals prèviament dejunats 4 h (a fi de normalitzar condicions; un dejú excessiu inhibeix la síntesi de lipoproteïnes). Abans de començar l'experiment es pren una mesura de la glucèmia i es recull sèrum per establir els valors basals. Els animals reben una injecció intraperitoneal de 500 mg Tyloxapol (Sigma) /kg de pes corporal, diluït al 11% p/v en PBS. A temps 90 i 180 min es repeteix la mesura de la glucèmia i recull de sèrum, que serà utilitzat posteriorment per mesurar el contingut de triglicèrids (anàleg de la producció de VLDL).

### 1.4.5 TEST DE SENSIBILITAT PERIFÈRICA A LA INSULINA

Es tracta d'un assaig per estimar la capacitat d'activació de la via de la insulina en resposta a un bolus de la hormona. Animals dejunats 12 h i prèviament anestesiats reben 1U /animal de insulina (Insulina Lispro, Humalog®, Lilly) a través de la vena aorta. Es mantenen en vida durant 1 minut (per permetre la circulació de la hormona injectada) i a continuació s'extreu la sang per punció cardíaca, així com els següents teixits (guardant l'ordre): fetge, teixit adipós i múscul.

## 1.5 PRESA DE MOSTRES

### 1.5.1 OBTENCIÓ DE SÈRUM

De forma general, l'extracció de sang es fa mitjançant una incisió a la part distal de la cua de l'animal. Es recullen uns 20-30 ul de sang en un *microvette* o tub capil·lar (Sarstedt). En els experiments a punt final, la sang s'extreu per punció cardíaca i es recull en un eppendorf.



En ambdós casos, el sèrum s'obté després de centrifugar les mostres 10 min a 5000 rpm a 4 °C, i és manté congelat a -20 °C fins al moment de la determinació dels diferents paràmetres.

### 1.5.2 OBTENCIÓ DE TEIXITS

Durant els diferents experiments, els teixits recollits són: fetge, teixit adipós epididimal, múscul (gastrocnemi). Un cop extrets, els teixits són pesats i congelats ràpidament en N<sub>2</sub> líquid i conservats a -80 °C fins al seu anàlisi.

En el cas del fetge, els diferents lòbuls s'utilitzen sistemàticament pels mateixos anàlisi (Figura 4).

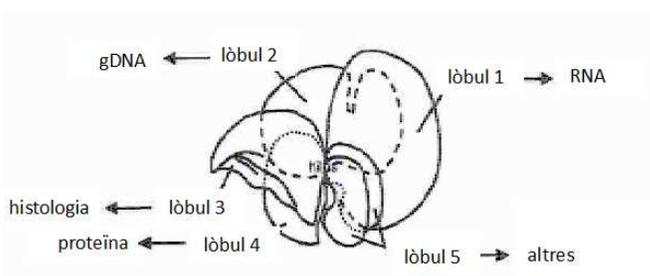


Figura 4. Presa de mostres del fetge.

### 1.5.3 EXTRACCIÓ I AÏLLAMENT DE ILLOTS PANCREÀTICS

S'han extret illots pancreàtics de ratolins adults a fi d'estudiar en condicions *in vitro* la secreció d'insulina estimulada per glucosa.

#### Protocol d'extracció

- Anestesià l'animal amb isofluorà abans de procedir al desnucament
- Col·locar l'animal en posició decúbit supí i rentar l'abdomen amb etanol per evitar la interferència dels pèls durant la dissecció
- Obrir la cavitat intraperitoneal i apartar els òrgans a fi de localitzar el colèdoc o conducte biliar comú
- Col·locar un "clamp" al colèdoc en la seva part més distal, a fi d'interrompre la connexió amb l'intestí
- Perfundir el pàncrees injectant a la part proximal del colèdoc (la més propera al fetge) 0,5 mg liberase (Liberase TL, Roche) /animal, en un volum final de 2 ml de medi de cultiu M199 (Invitrogen) sense FBS. Utilitzar una agulla G29
- Disseccionar i extreure el pàncrees, i col·locar-lo en un falcon de 50 ml amb 10 ml de M199-FBS

## Protocol d'aïllament

- Incubar els pàncrees 24 min a 36 °C
- Col·locar els tubs en gel, a fi d'aturar la reacció de digestió i afegir medi M199 suplementat amb FBS 10 % fins a un volum de 35 ml. Homogeneïtzar el contingut dels tubs per agitació
- Centrifugar 1.5 min a 1200 rpm i 4 °C
- Descartar el sobrenedant, i repetir el pas anterior 2 vegades
- Afegir 10 ml M199+FBS i pipetejar fins homogeneïtzar el contingut del tub
- Filtrar l'extracte a través d'un filtre de 400 µm i recollir el filtrat en un nou falcon de 50 ml
- Rentar les parets del falcon utilitzat prèviament amb 10 ml de M199+FBS i filtrar de nou el contingut en el mateix falcon de recol·lecció
- Centrifugar 5 min a 1400 rpm i 4 °C
- Descartar el sobrenedant
- Afegir 13 ml de Histopaque (Sigma) i homogeneïtzar amb l'ajuda de la pipeta [donat que l'Histopaque és tòxic, s'ha de treballar amb agilitat]
- Afegir, amb molta cura i amb l'ajuda d'una pipeta pasteur, medi M199+FBS fins a 25 ml. No agitar els tubs per evitar trencar les fases del gradient
- Centrifugar 24 min a 2500 rpm i 4 °C, amb acceleració i desacceleració 0
- "Pesca" els illots de la interfase entre el medi i l'Histopaque amb l'ajuda d'una pipeta pasteur, transferir-los a un nou falcon i afegir medi M199+FBS fins 45 ml
- Rentar els illots tres vegades segons les següents condicions:
  - 2.5 min, 1400 rpm, eliminar sobrenedant fins 25 ml
  - 2 min, 1300 rpm, eliminar sobrenedant fins 25 ml
  - 1.5 min, 1200 rpm, eliminar sobrenedant fins 25 ml
- Afegir medi M199+FBS fins 45 ml i deixar sedimentar els illots durant 6 min
- Repetir la sedimentació gravitatòria 3 vegades
- Eliminar sobrenedant fins 20 ml i transferir els illots a una placa de Petri
- Amb l'ajuda d'una pipeta i una lupa binocular, procedir a la pesca dels illots distingint-los per la seva forma esfèrica, color blanc i marge refringent

## 1.6 ANESTÈSIA I EUTANÀSIA

De forma general, per l'anestèsia de ratolins ICR (CD1) s'utilitza isofluorà (Forane, Abbot) administrat a demanda de forma inhalada. En alguns experiments, com en el cas de l'assaig de sensibilitat a la insulina, s'utilitza 6 ml pentobarbital sòdic (Dolethal, Vetóquinol) /kg de pes corporal diluït 1:5 en aigua destil·lada i administrat intraperitonealment.

En el punt final dels experiments, l'animal és sacrificat per dislocació cervical en els casos on és necessària la recollida de mostres, o bé intoxicació amb CO<sub>2</sub> quan es vol desestimar el cos de l'animal.

## 2. TÈCNIQUES DE CULTIU CEL·LULAR I EXPERIMENTS *IN VITRO*

### 2.1 SECRECIÓ D'INSULINA ESTIMULADA PER GLUCOSA

Per aquest assaig *in vitro* on s'utilitzen illots frescos obtinguts mitjançant el protocol d'extracció i aïllament d'illots pancreàtics (descriu en l'Apartat 1.5.3). L'objectiu de l'assaig és estudiar la capacitat de secreció d'insulina en resposta a glucosa per part de la cèl·lula  $\beta$ .

S'utilitza medi KRB, de composició: 125 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1.28 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgCl}_2$  i 25 mM HEPES. Vf 1L pH 7.4

- Dipositar els illots en una placa de petri de 3 cm de diàmetre amb 5 ml de KRB + 2.8 mM glucosa (D-(+)-glucose solution 45 %, Sigma), i incubar 1 h a 37°C
- Col·locar 15 illots/eppendorf amb 0.5 ml de KRB + 2.8 mM, 5.5 mM o 16.5 mM de glucosa. Incubar 1 h a 37°C amb els eppendorfs destapats per facilitar l'intercanvi de gasos. Agitar els eppendorfs cada 10 min
- Recollir 300  $\mu\text{l}$  de medi a 1 h
- Rentar amb PBS. Centrifugar 30 s 250 rpm. Descartar medi i guardar els illots a -80 °C (per quantificar proteïna i normalitzar els valors de secreció)

## 3. TÈCNIQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 3.1 PREPARACIÓ I ANÀLISI DE ARN

#### 3.1.1 EXTRACCIÓ DE ARN

L'extracció d'ARN s'ha realitzat a partir de teixit congelat immediatament després de la seva extracció en nitrogen líquid i posterior manteniment a -80°C. Durant la purificació, la manipulació de l'ARN s'ha fet en fred (treballant sobre gel) amb material autoclavat i aigua DEPC per eliminar la possibilitat de degradació per RNAses.

- Afegir 1 ml Trizol (TRI Reagent®, Sigma)/ 50-100 mg de teixit
- Homogeneïtzar el teixit amb l'ajuda d'un polítró (Polytron PT 2100, Ciberdem) fins que quedi totalment disgregat
- Afegir 0.2 ml cloroform (Sigma), agitar bé i incubar 5 min a temperatura ambient
- Centrifugar 15 min a 12000 rpm i 4 °C
- Pipetejar (2x100 $\mu\text{l}$ ) la fase superior en un nou eppendorf i afegir 0.5 ml isopropanol (Sigma). Agitar bé per inversió i incubar 10 min a temperatura ambient
- Centrifugar 10 min a 12000 rpm i 4 °C
- Rentar x2 el pellet amb 1ml EtOH 75 %
- Centrifugar 10 min a 12000 rpm i 4 °C
- Descartar el sobrenedant i deixar secar els pellets
- Resuspendre amb 20  $\mu\text{l}$  d' aigua DEPC

Amb l'ajuda d'un nanodrop (Spectrophotometer ND1000; software ND1000 v3 5.2) es determina l'absorbància a  $\lambda$  260 i es calcula la concentració de la mostra segons la fórmula:

$$[\text{ARN}] (\text{ug/ul}) = A_{260} \times 40 / \text{ul ARN total}$$

La puresa de la preparació d'ARN es valora segons les relacions  $A_{260} / A_{280} \geq 1$  i  $A_{260} / A_{230} \geq 2$ . Relacions inferiors són indicatives de contaminació per proteïnes o substàncies aromàtiques (fenol, etc).

### 3.1.2 OBTENCIÓ DE cDNA PER RETRO-TRANSCRIPCIÓ DEL mRNA

A partir de 1 ug d'ARN total diluït en un volum final de 20 ul (la quantitat recomanada és de l'ordre de 100 ng – 5 ug d'ARN total), amb 0.5 ug hexàmers aleatoris com a encebadors, retrotranscriptasa MLV-RT i reactius de Promega, seguint el protocol descrit a continuació, s'obté una població de cDNA corresponent al mRNA total de la mostra.

1 ug ARN

0.5 ug hexàmers aleatoris (random primers)

en un volum final de 10 ul H<sub>2</sub>O, 5 min a 70 °C

afegir a la mescla anterior

1 ul RNA inh

1 ul MLV-RT

1 ul dNTPs

4 ul Buffer 5X

2 ul H<sub>2</sub>O

i col·locar en un termociclador (DNA Engine, Peltier Thermal Cycler – BioRad), durant 1 h a 37 °C

### 3.1.3 ANÀLISI DE cDNA PER PCR QUANTITATIVA A TEMPS REAL (qRT-PCR)

La tècnica de PCR (Polymerase chain reaction, reacció en cadena de la polimerasa) quantitativa o a temps real (qPCR) permet observar l'amplificació dels diferents transcrits al llarg dels cicles i fer-ne una quantificació. Existeixen diverses formes per tal de fer aquest seguiment amb diferents fluoròfors i encebadors. S'ha utilitzat com a fluoròfor SYBR Green (SYBR® Green Jump Start™ Taq ReadyMix™, Sigma), que s'uneix a la doble cadena d'ADN. La fluorescència que s'observa és proporcional a l'amplificació del transcrit.

Quan es passa cert límit de fluorescència (*threshold*), es considera que el gen d'estudi s'expressa, i el cicle en el que això succeeix es defineix com Ct (*threshold cycle*). Per establir un punt de tall on es considera que el gen d'interès no es present en la mostra, s'aplica l'algoritme que de forma automàtica executa el programa SDS (Sequence Detection System, sistema de detecció de seqüències d'Applied Biosystems), el qual es basa en seleccionar un punt suficientment elevat per diferenciar entre el soroll de fons i un suficientment baix per no arribar al límit de saturació (fase exponencial del senyal).

En cada pou de placa de 96 (Applied Biosystems) es du a terme la reacció d'amplificació per un gen i una determinada mostra. Es fan duplicats de mostra. El contingut de cada pou és el següent:

10 ul	SYBR Green (SYBR® Green Jump Start™ Taq ReadyMix™, Sigma)
0.06 ul	encebador L
0.06 ul	encebador R
7.88 ul	H <sub>2</sub> O destil·lada
2 ul	cDNA

Els encebadors per als diferents gens d'estudi (veure Annex 1) han estat dissenyats amb l'ajuda del programa *Primer Output 3.0* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>).

El termociclador utilitzat per dur a terme la reacció d'amplificació és ABI Prism 7500 Real Time PCR System i el software 7500 Software v.2.0.4 (Applied Biosystems), amb el protocol descrit a continuació:

1 min	50 °C
2 min	95 °C
40x:	15 s 95 °C (desnaturalització)
	1 min 60 °C (anellament i extensió)
	15 s 95 °C

(corba de dissociació segons condicions de 7500 RT PCR System)

Tot i que la tècnica permet la quantificació absoluta d'un determinat cDNA (mRNA) en termes de número de còpies (si es fa servir una recta patró), s'han determinat els valors relatius al grup control, segons el càlcul de la  $\Delta\Delta Ct$ . Així, els càlculs realitzats per determinar el contingut de cDNA (mRNA) relatiu al grup control són:

$$\begin{aligned}\Delta Ct &= Ct \text{ gen d'estudi} - Ct \text{ gen normalitzador} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct \text{ mostra problema} - \Delta Ct \text{ mostra de referència} \\ \text{Quantitat relativa de mRNA} &= 2 \text{ EXP}(-\Delta\Delta Ct)\end{aligned}$$

On el gen normalitzador s'expressa de forma homogènia en les diferents mostres emprades. En aquesta tesi s'utilitza com a gen normalitzador la ciclofilina (Cyclophilin) o l'Actina (Actb).

## 3.2 ANÀLISI DE PROTEÏNES

### 3.2.1 PREPARACIÓ D'HOMOGENATS

L'estudi del contingut proteic es du a terme en condicions desnaturalitzants. Per l'extracció proteica s'utilitza el *Lysis Buffer* (descriu a l'Annex 1).

- Pipetejar 1 ml de *Lysis Buffer* en un *Douncer* i afegir 100 mg de teixit preservat en neu carbònica
- Homogeneïtzar la mescla i transferir a un eppendorf amb l'ajuda d'una pipeta *pasteur*. Deixar reposar 30 min en gel
- Sonicar 4x durant 10 s a 21 % amplitud en intervals d'1 min entre cicles
- Centrifugar durant 15 min a 14000 rpm i 4 °C
- Traspasar el sobrenedant a un nou eppendorf

### 3.2.2 VALORACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNA ALS HOMOGENATS

La quantificació de proteïnes requereix un patró de BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma) amb el mateix tampó en el que es tenen les mostres (entre 0 i 5 ug/ul per estar dins del rang de linealitat del mètode), que es pot guardar a -20 °C i reutilitzar.

El mètode d'elecció ha estat el mètode Bradford, utilitzant plaques ELISA de 96 pouets i seguint el protocol descrit a continuació

5 ul patró /homogenat diluït 1/40 en H<sub>2</sub>O  
 200 ul reactiu Bradford (Quick Start Bradford 1x Dye, BioRad)  
 lectura a λ 595 nm

La concentració de treball s'ajusta a 5 mg /ml fent dilucions de les mostres amb *Lysis Buffer*.

### 3.2.3 ANÀLISI DE PROTEINES PER WESTERN BLOT

#### Preparació de les mostres:

10 ul mostra (5 mg /ml)  
 6 ul tampó de càrrega 3x  
 1.8 ul DTT  
 escalfar 5 min a 95 °C

**Separació de proteïnes per SDS-PAGE:** a major mida de la proteïna a analitzar es requereix menor concentració d'acrilamida per aconseguir una bona separació. Es carreguen 100 ug de mostra. El gel concentrador (*stacking*) es prepara al 4 % d'acrilamida, mentre que el percentatge d'acrilamida del gel separador (*resolving*) és del 10 %. Com a marcador de pes molecular s'utilitza *Precision Plus protein Kaleidoscope Standard* (BioRad). Un cop carregades les mostres en els pous del gel concentrador es du a terme l'electroforesi a 120 V durant 60 min o fins que el Blau de Bromofenol surt del gel [veure composició dels gels i buffer d'electroforesi a l'Annex 1].

**Electrotransferència:** permet el pas de les proteïnes del gel a la membrana. S'utilitzen membranes de nitrocel·lulosa (Amersham). La transferència es du a terme de forma general a 350 mA durant 75 min en tampó de transferència 1X amb un 20 % de metanol, en un

ambient fred (gel o cambra freda) a fi d'evitar escalfament de les membranes que puguin danyar les proteïnes. [veure composició dels *buffer* d'electrotransferència a l'Annex 1]

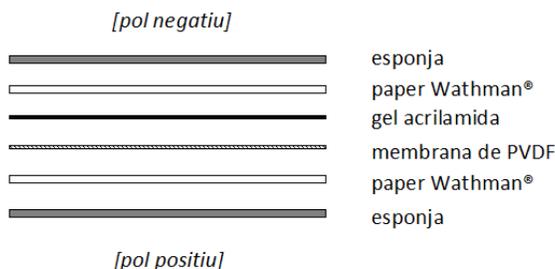


Figura 5. Esquema de montatge d'un cassette de transferència.

**Bloqueig de la membrana:** evita unions inespecífiques de l'anticòs a la membrana. Com a solució de bloqueig s'ha utilitzat llet en pols (Sigma) al 5 % en TBS-T. Per al bloqueig es submergeix la membrana en la solució de bloqueig durant 60 min.

**Immunodetecció:** l'anticòs primari detecta la proteïna d'interès. Incubar les membranes durant 16 h (o *overnight*) a 4 °C amb la dilució adequada d'anticòs (segons fabricant) en una solució de 5% llet en TBS-T. Rentar les membranes 3x amb TBS-T durant 5 min. Incubar les membranes amb l'anticòs secundari (conill o ratolí segons indiqui fabricant) diluït 1:2500 en TBS-T durant 60 min. Rentar les membranes 6x amb TBS-T durant 5 min [veure referències dels anticòsos utilitzats a l'Annex 1].

**Revelat:** l'anticòs secundari està conjugat a l'enzim peroxidasa de rave (HRP), que permet visualitzar les bandes corresponents a les proteïnes que el primari reconeix gràcies a la generació d'un producte quimioluminiscent quan s'incuba durant un minut amb una barreja 1:1 dels reactius Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). El revelat es du a terme contactant les membranes amb pel·lícules fotogràfiques (CL-Xposure™ Film, Thermo Scientific) durant un temps variable, utilitzant líquids tradicionals de revelat i fixat i l'equip (Kodak K Medical X-ray Processor 2000, Carestream).

**Densitometria:** l'estimació quantitativa de les proteïnes es realitza per anàlisi densitomètric dels films mitjançant el programa Quantity One® BioRad Laboratories. Els resultats s'expressen com a unitats arbitràries (relació entre la intensitat ajustada de la banda de la proteïna en estudi i de la proteïna normalitzadora).

## 4. TÈCNIQUES HISTOLÒGIQUES

### 4.1 PREPARACIÓ DE MOSTRES HISTOLÒGIQUES

Les mostres per realitzar l'estudi histològic s'obtenen a partir de teixits submergits en formaldehid immediatament després de la seva dissecció. L'obtenció de seccions així com la tinció amb Hematoxilina-Eosina s'han dut a terme al Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic. Les seccions tenen un gruix de 5  $\mu\text{m}$ .

### 4.2 ESTUDI DE LA MIDA DELS ADIPÒCITS I LA DENSITAT CEL·LULAR

L'estudi de la mida dels adipòcits així com la densitat cel·lular del teixit adipós es realitza a partir de 8-10 preparacions histològiques /grup experimental.

Amb l'ajuda del programa *Leica Application Suite v.2.8.1* inclòs en el software del microscopi LEICA DFC 300 FX es prenen imatges a 10X i 20X de les diferents mostres. L'anàlisi es du a terme amb l'ajuda del programa d'anàlisi d'imatges *Image J* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). La distribució de la mida dels adipòcits es calcula considerant el diàmetre més gran de cada adipòcit inclòs en la diagonal més llarga de cada secció i calculant la freqüència relativa dels diferents diàmetres.. La densitat cel·lular s'obté corregint el nombre de cèl·lules /secció.

### 4.3 MESURA DE LA MASSA DE CÈL·LULA $\beta$

La mesura de la massa de cèl·lula  $\beta$  s'ha dut a terme en col·laboració amb la Dra. Téllez del Servei d'Endocrinologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge (IDIBELL), Barcelona.

La massa de cèl·lula  $\beta$  es quantifica per morfometria de contacte de punts en seccions tenyides amb immunoperoxidasa (Montanya E, 2009). S'utilitza una patró de 48 quadrants. Les seccions s'incuben amb anticòs de conill per insulina humana (1/100, Santa Cruz Biotechnology) i es visualitzen mitjançant un sistema LSAB+<sup>HRP</sup> (DAKO) (Weibel ER, 1979). Es conta una mostra representativa d'uns 20000 punts /pàncrees en almenys 3 seccions (150 $\mu\text{m}$ ) per cada animal. El volum relatiu de cèl·lula  $\beta$  es calcula dividint el nombre de punts corresponents a cèl·lula  $\beta$  respecte el nombre total de punts del teixit pancreàtic. La massa de cèl·lula  $\beta$  s'obté multiplicant el volum relatiu pel pes del pàncrees.



## 5. DETERMINACIONS BIOQUÍMIQUES

### 5.1 DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES SÈRICS

#### 5.1.1 DETERMINACIÓ DE GLUCOSA

El control de la glucèmia es realitza a través d'una gota de sang de la part distal de la cua, mitjançant una incisió. S'utilitza un glucòmetre *Glucose Meter Elite* (Menarini) amb tires reactives que retornen el valor de la glucèmia en 5 segons.

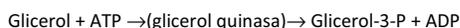
#### 5.1.2 DETERMINACIÓ D'INSULINA

La insulina en sèrum es determina per ELISA (Millipore) seguint les indicacions del fabricant. S'utilitzen 5 ul /animal.

#### 5.1.3 DETERMINACIÓ DE TRIGLICÈRIDS (TAG), GLICEROL I ÀCIDS GRASSOS LLIURES (AG)

Per la mesura de triglicèrids (TAG) i glicerol es segueix el protocol establert pel fabricant (Sigma). S'utilitzen 2.5 ul sèrum /animal i es fan mesures per duplicat. La recta patró es fa amb dilucions seriades de glicerol 2.26 mM.

La mesura de triglicèrids es basa en l'acoblament de les següents reaccions, que genera un producte que es pot quantificar per espectofotometria.



on la primera reacció correspon al glicerol lliure, per tant la lectura per espectofotometria en aquest punt permet quantificar el glicerol.

Per la mesura dels àcids grassos lliures (AG) es segueix el protocol establert pel fabricant (DiaSys). S'utilitzen 5 ul sèrum /animal i es fan mesures per duplicat. La recta patró es fa amb dilucions en paral·lel d'àcid palmític 1 mM.

La mesura d'àcids grassos lliures es basa en l'acoblament de les següents reaccions, que genera un producte que es pot quantificar per espectofotometria.

AG no esterificat + coenzim A + ATP →(Acil-coenzim A sintasa)→ Acil-Coa + AMP+PPi

Acil-CoA + O<sub>2</sub> →(Acil-coenzim A oxidasa)→ 2,3-trans Enoyl CoA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Trinder →(peroxidasa)→ colorant + 4 H<sub>2</sub>O

#### 5.1.4 DETERMINACIÓ DE COLESTEROL TOTAL (TC), COLESTEROL HDL I COLESTEROL LLIURE (fCE)

Tan per la mesura de colesterol total (TC) com colesterol HDL s'utilitzen kits de BioSystems, seguint les indicacions del fabricant. S'utilitzen 2 ul sèrum /animal i es fan mesures per duplicat.

En el cas del colesterol total (TC) s'utilitza colesterol 200 mg /dl (5.18 mM) per establir una recta patró a partir de dilucions seriades. En el cas del colesterol HDL, la patró es fa a partir del calibrador HDL /LDL, provinent de sèrum humà i concentració 5.18 mM.

En ambdós casos el fonament de la tècnica és el mateix. L'acoblament de les reaccions descrites a continuació origina un complex colorit que es quantifica per espectrofotometria.

Colesterol esterificat + H<sub>2</sub>O →(col. Esterasa)→ colesterol + àcid gras

Colesterol + ½ O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O →(col. oxidasa)→ colestenona + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-Aminoantipirina + fenol →(peroxidasa)→ quinonaimina + 4 H<sub>2</sub>O

D'altra banda, la mesura de colesterol lliure (fCE) s'ha dut a terme únicament al Center for Liver, Digestive and Metabolic Diseases, department of Pediatrics, UMCG, Groningen, Holanda.

Per a l'homogenat lipídic es fa una extracció lipídica amb dissolvents orgànics (cloroform / metanol) a partir de 300 mg de teixit amb la tècnica *Bligh & Dyer* establerta al laboratori (Bligh EG, 1959).

Sota el mateix fonament teòric i seguint el protocol del fabricant (DiaSys) s'utilitzen 50 ul sèrum /animal i un estàndard de colesterol lliure 2.59 mM a partir del qual es fan dilucions seriades.

#### 5.1.5 DETERMINACIÓ DE β-HIDROXIBUTIRAT (β-HB)

El β-hidroxibutirat és el cos cetònic més abundant. La seva mesura es realitza seguint el protocol del fabricant (BioVision). S'utilitzen 5 ul sèrum /animal i un estàndard 10 mM com a calibrador.

La mesura del  $\beta$ -hidroxibutirat es realitza a partir del complex colorimètric resultant del producte de la  $\beta$ -HB deshidrogenasa amb la sonda colorimètrica de l'assaig.



### 5.1.6 DETERMINACIÓ DE LACTAT

El lactat és un substrat per la síntesi d'àcids grassos. Es mesura seguint el protocol del fabricant (BioVision). S'utilitzen 5 ul sèrum /animal i un estàndard 100 mM com a calibrador.

La mesura del lactat es realitza a producte resultant de la D-lactat deshidrogenasa amb la sonda colorimètrica de l'assaig.



### 5.1.7 DETERMINACIÓ D'ADIPOQUINES

En el primer capítol de resultats els nivells de leptina es mesuren mitjançant ELISA. S'utilitzen 2 ul sèrum/animal, es fan duplicats i es segueix el protocol que indica el fabricant (Millipore).

En el segon capítol de resultats s'aprofundeix en l'estudi de les adipoquines. A fi de mesurar els nivells en sèrum de les principals adipoquines s'utilitza un panell *MILLIPLEX® Map Mouse Metabolic Bead Panel #MMHMAG-44k* (Millipore) que permet la quantificació simultània de IL-6, MCP-1, TNF $\alpha$ , resistina i leptina. Seguint el protocol del fabricant s'utilitzen 10 ul sèrum /animal. En aquest cas no es fan duplicats per motius d'espai.

L'assaig es fonamenta en la captura de l'anàlit per part de boles magnètiques que es retenen en la superfície de treball (placa de 96 pous). En presència de l'anticòs es forma un immunocomplex. Aquest es detecta gràcies a la reacció posterior entre el radical biotinitat unit a l'anticòs i un conjugat amb estreptavidina-ficoeritrina, que són excitats per mitjà d'un làser. La fluorescència es quantifica de forma digital amb l'aparell *Luminex 100™ IS* (Millipore) del Departament de Recerca en Diabetis i Metabolisme de la Vall d'Hebron.

### 5.1.8 ANÀLISI DE LIPOPROTEÏNES

La cromatografia líquida de proteïnes FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) és un tipus de cromatografia que s'utilitza per separar diferents components d'una mostra (fase mòbil) en funció de l'afinitat a una fase estacionària.

Constitueixen la fase mòbil 350 ul totals formats per una barreja equitativa de sèrum d'animals del grup C, així com un altra barreja equitativa de sèrums d'animals del grup ON, que es fan córrer a un flux constant de 0.5 ml /min en un aparell *FPLC Akta Purifier* amb una columna de superosa *6HR 10 /300 GL* (GE Healthcare) (fase estacionària) utilitzant PBS com a *running buffer*.

El fraccionament de la mostra comença a 18 min amb 0.5 ml per fracció. Els diferents tipus de lipoproteïnes de la mostra es troben entre les fraccions 1-50, en les quals es mesuren els nivells de triglicèrids i colesterol mitjançant els protocols descrits en els apartats 5.1.3 i 5.1.4 respectivament.

## 5.2 DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES TISSULARS

### 5.2.1 DETERMINACIÓ HEPÀTICA I MUSCULAR DE TRIGLICÈRIDS (TAG)

El contingut de triglicèrids en fetge i múscul es quantifica a partir de 15 mg de teixit homogenats en 300 ul del tampó d'homogeneïtzació descrit a continuació (preparat fresc amb reactius Sigma):

50 mM	Tris
100 mM	KCl
20 mM	KF
0.5 mM	EDTA
0.05%	Lubrol Px
pH 7.9	

La homogeneïtzació es du a terme amb l'ajuda del sonicador. A continuació es centrifuguen les mostres 15 min a 11000 g (15000 rpm) i 4 °C. El sobrenedant s'utilitza per mesurar els triglicèrids.

Es segueix el protocol descrit pel fabricant (Sigma), utilitzant 2.5 ul mostra /ratolí i un estàndard de glicerol 2.26 mM per a la patró.

La tècnica es basa en l'acoblament de les reaccions descrites en l'apartat 5.1.3, que genera un producte quantificable per espectofotometria.

### 5.2.2 DETERMINACIÓ HEPÀTICA DE COLESTEROL TOTAL (TC) I COLESTEROL LLIURE (fCE)

El contingut de colesterol total (TC) i colesterol lliure (fCE) en fetge es quantifica a partir de 15 mg de teixit homogenats en 300 ul del tampó de homogeneïtzació descrit en l'apartat anterior.

Per la mesura de colesterol total (TC) es segueixen les indicacions del fabricant (BioSystems). S'utilitzen 2 ul sèrum /animal i les fan mesures per duplicat. La patró es fa a partir de colesterol 200 mg /dl.

El fonament de la tècnica es troba descrit en l'apartat 5.1.4.

La mesura de colesterol lliure (fCE) en fetge s'ha dut a terme únicament al Center for Liver, Digestive and Metabolic Diseases, department of Pediatrics, UMCG, Groningen, Holanda.

Per a l'homogenat lipídic es fa una extracció lipídica amb dissolvents orgànics (cloroform /metanol) a partir de 300 mg de teixit amb la tècnica *Bligh & Dyer* establerta al laboratori (Bligh EG, 1959).

Sota el mateix fonament teòric i seguint el protocol del fabricant (DiaSys) s'utilitzen 50 ul homogenat lipídic /animal i un estàndard de colesterol lliure 2.59 mM a partir del qual es fan dilucions seriades.

### 5.2.3 DETERMINACIÓ HEPÀTICA DE FOSFOLÍPIDS (PL)

La mesura de fosfolípids (PL) s'ha dut a terme Center for Liver, Digestive and Metabolic Diseases, department of Pediatrics, UMCG, Groningen, Holanda.

Per determinar el contingut de fosfolípids al fetge s'utilitza l'homogenat lipídic resultant de l'extracció lipídica amb dissolvents orgànics (cloroform /metanol) a partir de 300 mg de teixit amb la tècnica *Bligh & Dyer* establerta al laboratori (Bligh EG, 1959).

S'utilitzen 75 ul homogenat lipídic /animal i un estàndard de fosfat 32 mM a partir del qual es fan dilucions seriades. Es segueix el protocol descrit a continuació:

- Evaporar l'homogenat lipídic
- Afegir 0.4 ml d'àcid perclòric ( $\text{HClO}_4$ ) 70% i desintegrar les mostres durant 30 min a 190 °C
- Atempter i afegir 4.5 ml de reactiu fosfat (2.2 gr amoniheptamolibdat; 14.3 ml àcid sulfúric concentrat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) en un total de 1 litre d'aigua)
- Afegir 0.5 ml d'àcid ascòrbic, homogeneïtzar i col·locar en un aigua bullint durant 10 min
- Atempter i llegir absorbància a  $\lambda$  750 nm

La mesura de la quantificació de fosfolípids és estable.

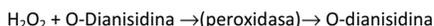
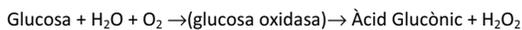
### 5.2.4 DETERMINACIÓ HEPÀTICA DE GLICOGEN

Els dipòsits hepàtics de glicogen es quantifiquen seguint un mètode basat en la precipitació bàsica del glicogen seguida d'una hidròlisi àcida, per finalment quantificar la glucosa alliberada.

A partir de 100 mg de teixit es segueix el protocol següent (precipitació bàsica + hidròlisi àcida):

- Homogeneïtzar el teixit amb 1 ml KOH 30 %
- Escalfar 15-30 min a 100 °C en el bloc sec (foradar la tapa dels eppendorfs)
- Centrifugar a 2000 rpm durant 20 min a 4 °C
- Afegir 50 ul de sobrenedant a un paper 31ET (*Chromatography paper Whatman, Sigma*) de 1.5 cm<sup>2</sup>. Afegir un paper control sense mostra per utilitzar-lo de background de glucosa
- Rentar 15 min amb etanol 66 % a -20 °C i en agitació
- Rentar 2x 30 min amb etanol 66 % a temperatura ambient
- Rentar els papers amb acetona pocs segons per eliminar les restes d'etanol
- Assecar completament els papers a temperatura ambient (deixar *overnight*)
- Introduir els papers en tubs de poliestirè amb 1 ml de solució de  $\alpha$ -aminoglucoSIDasa 0.5 ml (25 U /l) /ml de tampó d'acetat sòdic 0.4 M a pH 4.8
- Incubar 120 min a 37 °C en agitació
- Centrifugar els sobrenedants 15 min a 2000 rpm i 4 °C

La concentració de glucosa alliberada (sobrenedant) es mesura amb el kit *GLUCOSE* de BioSystems seguint les indicacions del fabricant. L'acoblament de les reaccions descrites a continuació origina un complex colorit que es quantifica per espectofotometria.



Els estàndards de glucosa que s'utilitzen són 0.111 mM (2 mg /dl), 0.2775 mM (5 mg /dl) i 0.555 mM (10 mg /dl).

### 5.2.5 ANÀLISI DE LA BIOSÍNTESI DE POLÍMERS

L'anàlisi de distribució de la massa isotopomèrica (*Mass Isotopomer Distribution Analysis, MIDA*) permet la quantificació de la biosíntesi de polímers *in vivo* (Hellerstein MK, 1992). En aquesta tesi, s'estudia la lipogènesi *de novo* així com la síntesi de colesterol. En ambdós casos és necessària la presència d'un isòtop marcat, que permet fer-ne el seguiment un cop incorporat a l'organisme.

#### LIPOGÈNESI DE NOVO

En el cas de la lipogènesi *de novo*, s'utilitzen fetges dels animals tractats amb [1-13C]-Acetat realitzat a l'estabulari de l'Hospital Sant Joan de Déu. L'assaig es du a terme al Center for Liver, Digestive and Metabolic Diseases, department of Pediatrics, UMCG, Groningen, Holanda, segons el protocol descrit a continuació.

## | Materials i Mètodes

- Afegir a 100 ul de homogenat hepàtic 15% en PBS
  - 100 ul d'estàndard intern (50 mg C17:0 /100 ml metanol)
  - 100 ul de solució BHT (1 gr BHT /100 ml metanol)
  - 2 ml de metanol /HCl (6N) (5:1 v/v)
  - tapar, homogeneïtzar i escalfar 4h a 96 °C
- Atemperar, afegir 2x2 ml d'hexà i recollir la fracció superior d'hexà en un tub de vidre després de centrifugar 5 min a 2000 rpm
- Evaporar 4 ml d'hexà a 45 °C amb N<sub>2</sub>
- Redissoldre els àcids grassos metilats en 200 ul d'hexà i transferir en un vial GC amb un insert

## Metilació

- Afegir per cada mostra 800 ul d'àcid clorhídric: metanol 1:20
- Escalfar 20-30 min a 55 °C
- Evaporar el fluid amb N<sub>2</sub> a 55 °C

## Derivatització

- Afegir 100 ul de BSTFA: Piridina: TMCS 5:5:0.1 fresc
- Deixar 12-16 h a temperatura ambient
- Evaporar els tubs amb N<sub>2</sub> a temperatura ambient
- Afegir 1000 ul d'hexà, homogeneïtzar amb l'ajuda del vòrtex i centrifugar 10 min a 2000 rpm
- Reemplaçar l'hexà a vials de 2 ml
- Concentrar en 150 ul d'hexà

L'enriquiment dels isòtops es determina per espectrometria de masses al servei de GC de Center for Liver, Digestive and Metabolic Diseases, department of Pediatrics, UMCG, Groningen, Holanda. UMCG, Groningen, Holanda.

## SÍNTESI DE COLESTEROL

En el cas de la síntesi de colesterol, s'utilitzen les mostres de gotes de sang impregnades en paper de filtre i recollides cada 12 h als animals tractats amb [1-13C]- Acetat a l'estabulari de l'Hospital Sant Joan de Déu. L'assaig es du a terme al Center for Liver, Digestive and Metabolic Diseases, Department of Pediatrics, UMCG, Groningen, Holanda, segons el protocol descrit a continuació.

- Tallar la gota de sang impregnada al paper de filtre i transferir a un eppendorfs
- Afegir 25 ul d'H<sub>2</sub>O i deixar 10 min a temperatura ambient
- Afegir 1 ml etanol (95 %) /Acetona 1:1, agitar i deixar reposar 12-16 h
- Centrifugar 10 min a 15000 rpm
- Transferir el fluid a un tub de vidre i deixar assecat amb N<sub>2</sub> a 50 °C

La derivatització dels colesterol que segueix a continuació es realitza de la mateixa manera que en els àcids grassos provinents del fetge. Les mostres són processades al servei de GC del Center for Liver, Digestive and Metabolic Diseases, Department of Pediatrics, UMCG, Groningen, Holanda..

## **6. ANÀLISI DE DADES**

De forma general, els resultats s'expressen com a mitjana aritmètica  $\pm$  error estàndard. Per a l'anàlisi estadístic s'utilitza un test t-Student o ANOVA (IBM SPSS Statistics 19, Madrid, Spain).  $P < 0.05$  es considera significatiu.





## **RESULTATS**



## 1. CARACTERITZACIÓ DEL FENOTIP “ON”



## 1.1 INTRODUCCIÓ

Les dades clíniques i epidemiològiques demostren que un augment ràpid de pes durant etapes primerenques de la vida està fortament associat amb molts components de la Síndrome Metabòlica, incloent malalties cardiovasculars, Diabetis tipus 2 i obesitat (McGill Jr, 1998; Jimenez-Chillaron JC, 2007; Leunissen RW, 2009; Durmus B, 2010; Lucas A, 2010).

Una de les principals causes del ràpid augment de pes neonatal és l'aport excessiu de calories (sobrenutrició) (McGill Jr, 1998). Es coneix que la nutrició en les primeres etapes de la vida és un factor clau que contribueix a la prevalença de la obesitat, així com a la resta de característiques de la Síndrome Metabòlica en l'edat adulta (Langley-Evans SC, 2006; Neu J, 2007; Patel MS, 2011; Jimenez-Chillaron JC, 2012; Wang X, 2013; Waterland RA, 2013). Existeixen models animals que confirmen les dades provinents d'estudis fets en humans (Plagemann A, 1992; Plagemann A, 2010; Boullu-Ciocca S, 2005). En aquests estudis els animals es mantenen amb una dieta estàndard normal des del deslletament, demostrant així que la sobrenutrició/ sobrecreixement *per se* augmenta el risc de desenvolupar malalties cròniques en l'edat adulta.

A partir d'aquestes evidències s'ha generat al laboratori un model murí de sobrenutrició i creixement accelerat durant l'alletament i se'n ha estudiat el fenotip amb l'objectiu de conèixer les conseqüències de la sobrenutrició neonatal en l'adult. Com es descriu en aquest capítol, els animals exposats a sobrenutrició durant l'etapa postnatal desenvolupen molts dels trets característics de la Síndrome Metabòlica.

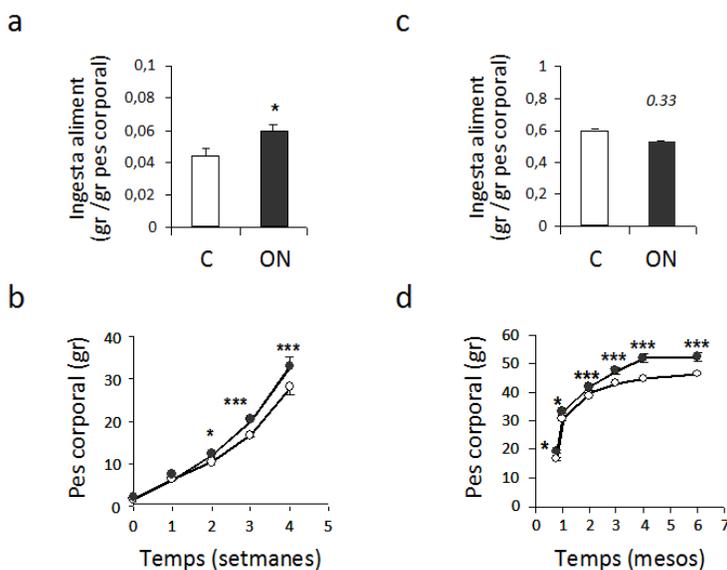
## | 1. Caracterització del fenotip ON

## 1.2 RESULTATS

### 1.2.1 SOBRENUTRICIÓ I CREIXEMENT POSTNATAL

En el model animal de sobrenutrició (overnutrition, ON), la sobrenutrició s'indueix disminuint el nombre de cries /mare després del naixement. Així, s'ajusta la ventrada a 8 cries /mare en el grup control (C) i 4 cries /mare en el grup de sobrenutrició (ON) (Apartat 1.1, Material i Mètodes). Al ser menys cries /mare, els animals grup ON tenen accés a més quantitat d'aliment. Cal remarcar que la dieta de la mare és normal i l'alletament lliure.

Als 4 dies de vida, la ingesta dels nounats del grup ON va ser superior a la del grup C (Figura 6a). Aquest fet va contribuir a un creixement accelerat en els animals del grup ON, que des de les primeres setmanes de vida tenien un pes corporal superior al grup C (Figura 6b). Aquestes diferències es van mantenir en l'edat adulta tot i la normalització de la ingesta. És a dir, els animals del grup ON pesaven més tot i menjar el mateix que els animals C (Figures 6c i 6d).

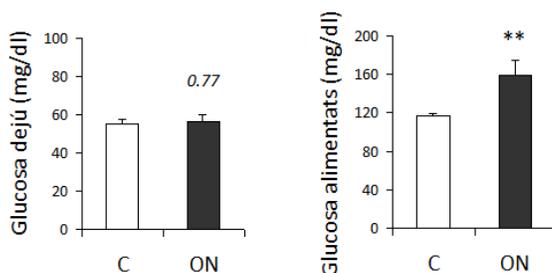


**Figura 6. Ingesta d'aliment i pes corporal dels animals.** a) Ingesta d'aliment als 4 dies de vida. La mesura es realitza per la diferència P1-P0, on P0 és el pes de les cries després de separar-les 1 h de la mare, i P1 el pes al cap d'1 h d'haver estat reintroduïdes. b) Pes corporal durant les primeres setmanes de vida. c) Ingesta d'aliment als 4 mesos de vida en un interval de una setmana. La mesura basal es realitza després de 4 h de dejú. d) Pes corporal al llarg dels mesos de vida.  $n \geq 6$  animals per grup. Resultats expressats com mitjana  $\pm$  SEM. *t* Student vs C: \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ .



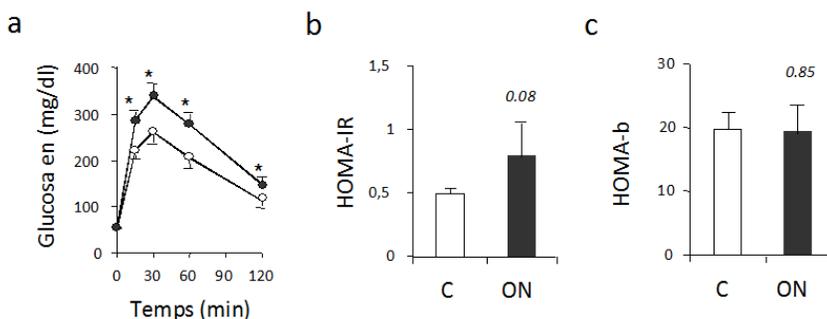
## 1.2.2 TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA

En primer lloc es van mesurar els nivells de glucosa en sèrum. En condicions de dejú les glucèmies dels animals ON eren similars al grup C. D'altra banda, els animals ON alimentats presentaven una hiperglucèmia significativa ( $P < 0.01$ ) (Figura 7).



**Figura 7. Nivells de glucosa en sèrum en animals de 4 mesos d'edat.** a) Glucosa en dejú. Animals dejunats 12h.  $n \geq 21$ . b) Glucosa en animals alimentats.  $n \geq 24$ . *t Student vs C: en cursiva p-valor \*\*  $P \leq 0.00$ .*

Per tal de caracteritzar metabòlicament els animals del grup ON, es va realitzar un test intraperitoneal de tolerància a la glucosa (ipGTT) en animals adults de 4 mesos d'edat. Els animals del grup ON presentaven alteracions en la tolerància a la glucosa, ja que partint d'un mateix *bolus* (2 gr de glucosa /kg de pes corporal) les glucèmies eren més altes al llarg de tot el test en comparació al grup C, inclús 120 min després de l'administració de glucosa (Figura 8a).



**Figura 8. Tolerància a la glucosa en animals de 4 mesos d'edat.** a) ipGTT (2 gr glucosa /kg pes corporal). b) Mesura de la sensibilitat a la insulina durant ipGTT segons l'índex  $HOMA-IR = [Glucosa (mU/l) \times Insulina (mg/dl)] / 405$ . c) Mesura de la secreció d'insulina durant ipGTT segons l'índex  $HOMA-b = \Delta Insulina_{30-0min} / \Delta Glucosa_{30-0min}$ . Animals dejunats 12 h.  $n \geq 6$  animals per grup. Resultats expressats com mitjana  $\pm$  SEM. *t Student vs C: \*  $P \leq 0.05$ .*

### 1.2.3 SENSIBILITAT A LA INSULINA

A partir de les mostres de sèrum extretes durant l'ipGTT, abans de l'administració de glucosa i 30 min després, es van mesurar els nivells d'insulina, a fi de calcular l'índex HOMA-IR (*Homeostasis Model of Assessment- Insulin Resistance*). L'HOMA-IR permet estimar la presència de resistència a la insulina. Per una altra banda, l'índex HOMA-b (*Homeostasis Model of Assessment- beta cell*) que, utilitza la relació entre la secreció d'insulina i els nivells de glucosa durant un interval de temps, permet estimar el funcionament de la cèl·lula  $\beta$  del pàncrees.

Els animals del grup ON van mostrar un augment de l'índex HOMA-IR indicatiu de resistència a la insulina (Figura 8b), en un context on la secreció d'insulina era comparable al grup C (Figura 8c).

A fi d'explorar la sensibilitat a la insulina dels teixits perifèrics es va dur a terme un assaig fisiològic *in vivo* de sensibilitat a la insulina, per determinar com responien els principals teixits sensibles a l'administració de 1 U insulina /kg de pes corporal. Es va estudiar l'activació de les principals proteïnes de la cascada de senyalització de la insulina (Akt i Gsk3) a través de la inducció de la seva fosforilació.

Es van fer *western blots* en fetge, teixit adipós i múscul, amb anticossos per a les diferents proteïnes, tant en la seva forma fosforilada (pAkt i pGsk3), com no fosforilada (Akt i Gsk3) (que es va utilitzar per normalitzar els resultats de les proteïnes fosforilades). Així mateix es van fer *western blots* per Actina b, com a control intern (Figura 9a).

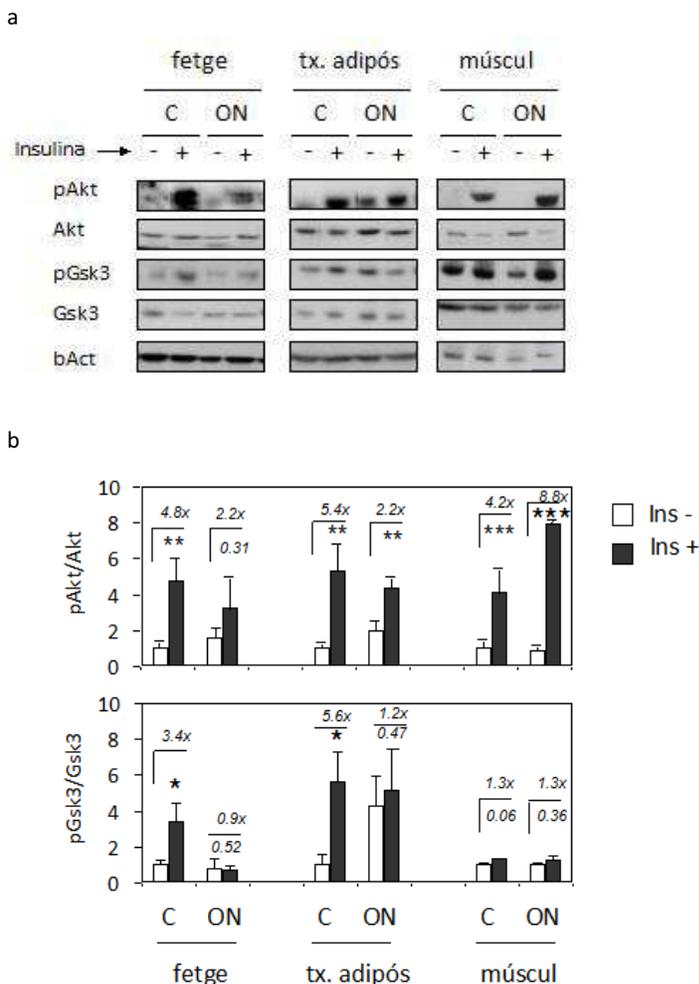
En primer lloc, al fetge, els animals del grup ON van mostrar un defecte en la capacitat d'activació de la via de senyalització d'insulina respecte els animals del grup C. En el grup control, l'increment de pAkt entre els animals sense insulina (C-) i els animals amb insulina (C+) va ser 4.8x ( $P < 0.01$ ). En canvi, l'increment de pAkt entre els animals sense insulina (ON-) i els animals amb insulina (ON+) va ser 2.2x ( $P = 0.31$ ). De la mateixa manera, a continuació es va mirar una de les dianes directes d'Akt: Gsk3. En el grup C l'activació de pAkt es traduïa en un augment 3.4x en els nivells de pGsk3 entre els animals dels grups C- i C+ ( $P < 0.05$ ). En canvi, en els animals ON l'activació no significativa de pAkt suposava únicament un augment 0.9x en els nivells de pGsk3 entre els grups ON- i ON+ ( $P = 0.52$ ) (Figura 9b). Per tant, es va observar resistència hepàtica a la insulina.

Al teixit adipós, els animals C van mostrar un increment de pAkt 5.4x entre els grups C- i C+ ( $P < 0.01$ ). Igualment, en els animals ON, l'increment de pAkt entre els grups ON- i ON+, tot i ser significatiu ( $P < 0.01$ ), era menor que en els animals C, 2.2x. L'efecte de pAkt sobre pGsk3 en els animals C va ser 5.5x ( $P < 0.05$ ), mentre que en els animals ON, va suposar únicament 1.2x ( $P = 0.47$ ) (Figura 9b). És a dir, en el cas del teixit adipós es va observar una alteració en la sensibilitat a la insulina, ja que tot i una activació significativa de la via (pAkt) en ambdós grups (C i ON), els animals ON no va respondre de la mateixa manera que els animals C més avall de la via (pGsk3).

Per últim, en el múscul esquelètic es va observar un increment de pAkt 4.2x entre els grups C- i C+ ( $P < 0.001$ ). Contràriament al que es va observar en altres teixits, en els animals ON,

## | 1. Caracterització del fenotip ON

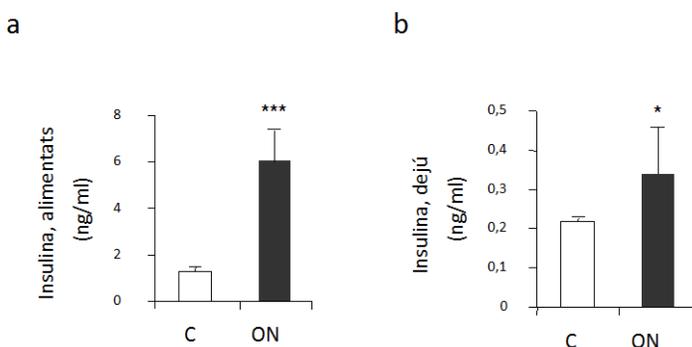
l'increment de pAKT entre els grups ON - i ON + va ser superior als animals C, 8.8x, ( $P < 0.001$ ). D'altra banda, aquesta major sensibilitat dels animals ON (segons l'increment de pAkt) no es va traduir en un augment dels nivells de pGsk3 en els animals ON, 1.3x ( $P = 0.36$ ) respecte als animals C, 1.3x ( $P = 0.06$ ) (Figura 9b). Per tant, en el múscul, la sensibilitat a la insulina en els animals ON va ser comparable als animals C.



**Figura 9. Assaig de sensibilitat perifèrica a la insulina en animals de 4 mesos d'edat.** Els animals reben 1 U /insulina a través de l'aorta. S'extreuen els teixits i es mesura l'activació de les principals proteïnes de la via de la insulina. a) Resultats de western blot de les diferents proteïnes en la seva forma fosforilada i sense fosforilar. S'utilitza Actina b (bAct) com a control intern. b) Mesura de la fosforilació d'Akt i Gsk3 en fetge, tx. adipós i múscul. Animals dejunats 12 h.  $n \geq 6$  animals per grup. Sobre la barra i en cursiva s'expressa la relació ON/C. Sota la barra s'expressa el valor de P segons *t Student* vs C, \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ .

En resum, segons l'assaig de sensibilitat a la insulina *in vivo* i el posterior estudi per *western blot* de les principals proteïnes de la via de senyalització de la insulina, els animals del grup ON presenten resistència a la insulina a nivell de fetge i teixit adipós.

També es van mesurar els nivells de insulina en sèrum. Tant en condicions de dejú com alimentació, els nivells d'insulina del grup ON van ser superiors al grup C (dejú,  $P < 0.001$ ; alimentats,  $P < 0.05$ ) (Figura 10).



**Figura 10. Nivells d'insulina en sèrum en animals de 4 mesos d'edat.** a) Insulina en animals dejunats 12h.,  $n \geq 10$ . b) Insulina en animals alimentats,  $n \geq 10$ . Resultats expressats com mitjana  $\pm$  SEM.  $t$  Student vs C, \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

A més, en l'assaig de sensibilitat a la insulina es va observar certa hiperactivació basal de la via en els animals ON, ja que tan en fetge com en teixit adipós, els nivells de pAkt en el grup ON- en la majoria de casos van ser superiors als del grup C-. És a dir, tot i no haver-hi un estímul extern (insulina) que induís l'activació de la via, existia una major activació basal (Figura 9b).

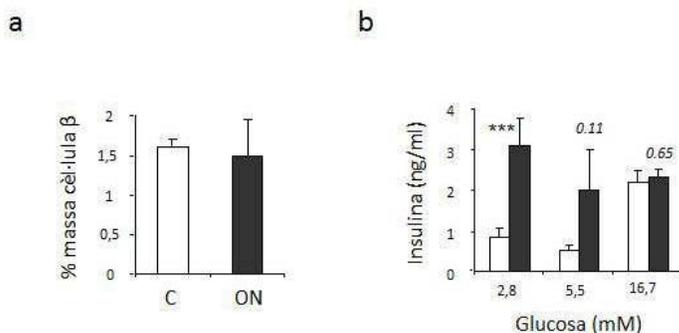
D'altra banda, tot i l'estima d'una sensibilitat a la insulina dels animals ON comparable als animals C, segons l'índex HOMA-b, es va realitzar un estudi més acurat de la massa de cèl·lula  $\beta$ , així com del seu funcionament. A nivell histològic no es van observar diferències de massa entre els animals C i ON (Figura 11a).

El funcionament de la cèl·lula  $\beta$  es va estudiar mitjançant un assaig *in vitro* de secreció d'insulina estimulada per glucosa., a partir d'illots pancreàtics d'animals adults (4 mesos) d'ambdós grups.

A concentracions baixes de glucosa (2.8 mM), els animals del grup ON presentaven una hipersecreció d'insulina respecte els animals del grup C ( $P \leq 0.001$ ). Aquesta tendència es repetia a concentracions normals (5.5 mM), encara que de forma no significativa ( $P = 0.11$ ). D'altra banda, a concentracions elevades de glucosa (16.7 mM) la secreció d'insulina per part del grup ON va ser similar al grup C ( $P = 0.65$ ) (Figura 11b).

## | 1. Caracterització del fenotip ON

Sembla doncs, que la hiperinsulinèmia del grup ON en condicions baixes de glucosa, és una resposta de cèl·lula beta a la resistència a la insulina.



**Figura 11. Estudi de la cèl·lula  $\beta$  en animals de 4 mesos de vida.** a) Massa de cèl·lula  $\beta$  quantificada per morfometria de contacte de punts en seccions tenyides amb immunoperoxidasa. Els resultats s'expressen en % de cèl·lula  $\beta$  en relació al pes del pàncrees. n  $\geq$  6 animals per grup. b) Assaig *in vitro* de secreció d'insulina estimulada per glucosa (2.8, 5.5 i 16.7 mM). S'utilitzen illots pancreàtics frescos extrets per perfusió del ducte pancreàtic amb col·lagenasa. n  $\leq$  6 animals per grup. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. t Student vs C, en cursiva p-valor, \* P  $\leq$  0.05; \*\* P  $\leq$  0.01.

La insulina promou la síntesi de lípids a partir de glucosa. Aquest procés té lloc principalment al fetge i els triglicèrids sintetitzats s'emmagatzemen al teixit adipós (Avramoglu RK, 2006). A partir d'aquesta informació, la resistència hepàtica i del teixit adipós, i la hiperinsulinèmia observada, va dirigir els següents experiments i assaig a l'estudi del metabolisme lipídic.

### 1.2.4 ESTUDI DEL METABOLISME LIPÍDIC

En el primer pas en l'estudi del metabolisme lipídic es van mesurar els nivells de triglicèrids en sèrum així com en altres teixits.

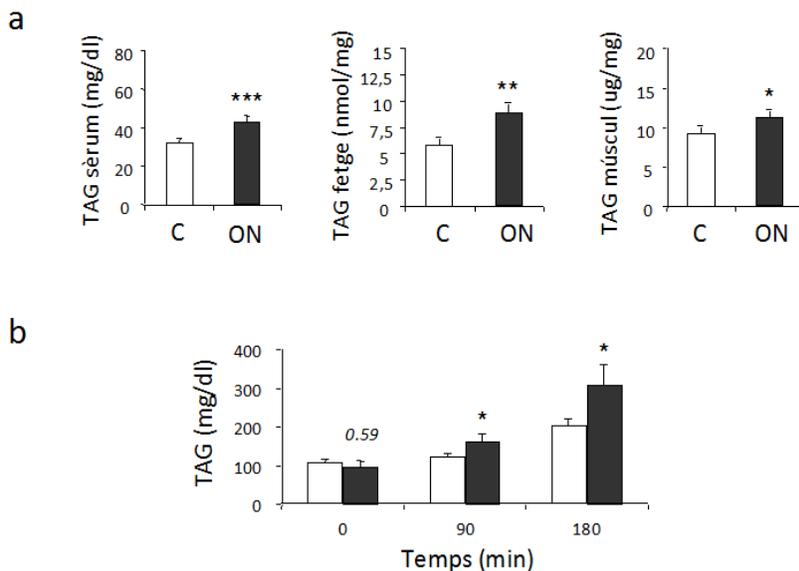
Es va observar una marcada hipertrigliceridèmia no tan sols en sèrum d'animals ON (P < 0.001) sinó també al fetge (P < 0.01) i múscul (P < 0.05) (Figura 12a). L'augment de triglicèrids en el grup ON portava a estudiar el fetge amb més profunditat.

Una de les principals funcions del fetge en relació al metabolisme lipídic és la síntesi de lipoproteïnes. Les lipoproteïnes són estructures que transporten lípids per tot l'organisme. Estan formades per diferents tipus de lípids i proteïnes: triglicèrids, fosfolípids, èsters de colesterol, colesterol i diferents apolipoproteïnes.

Per estudiar la producció de lipoproteïnes es va dur a terme un assaig de Tyloxapol. Abans de l'administració de Tyloxapol, els nivells triglicèrids del grup ON eren similars al grup C. Per

contra, a 90 i 180 min després de l'administració els nivells de triglicèrids en el grup ON era superior ( $P < 0.05$ ) (Figura 12b). Això indicava un augment de producció de VLDL en el grup ON.

A continuació es va estudiar si l'augment de la producció de lipoproteïnes es deu a una alteració en l'expressió de gens lipogènics i lipolítics del fetge.



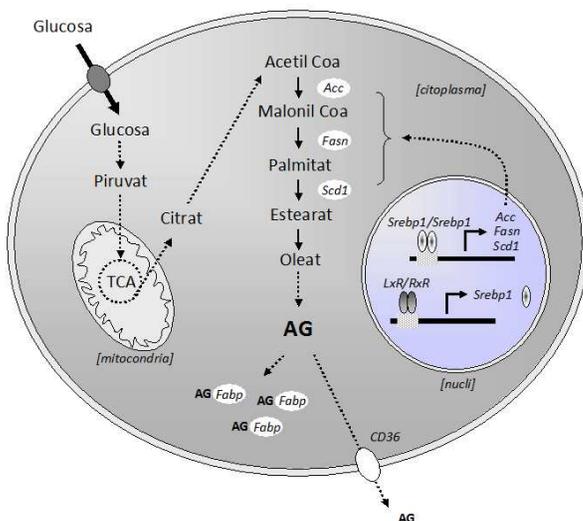
**Figura 12. Contingut de triglicèrids i producció de lipoproteïnes en animals de 4 mesos de vida.** a) Contingut de triglicèrids en sèrum, fetge i múscul. b) Producció de lipoproteïnes després de l'administració de 500 mg Tyloxapol /kg de pes corporal. Animals dejunats 4 h.  $n \geq 12$ . Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. *t Student vs C*, en cursiva p-valor, \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

Es va analitzar l'activitat transcripcional dels principals gens lipogènics i lipolítics (Figura 13a i b) a través de la quantificació dels nivells de mRNA. (amplificació mitjançant qPCR).

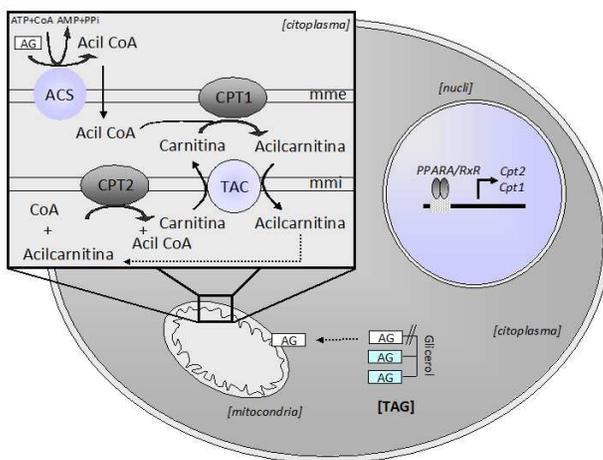
No es van observar diferències significatives en l'expressió dels diferents gens lipogènics, en part, probablement, a la dispersió dels resultats (Figura 14a). Tampoc es van observar diferències en l'expressió dels principals gens lipolítics, tot i mostrar una variabilitat més reduïda (Figura 14b). Per tant, no existeix una alteració en l'expressió de gens lipogènics i lipolítics al fetge dels animals del grup ON.

# | 1. Caracterització del fenotip ON

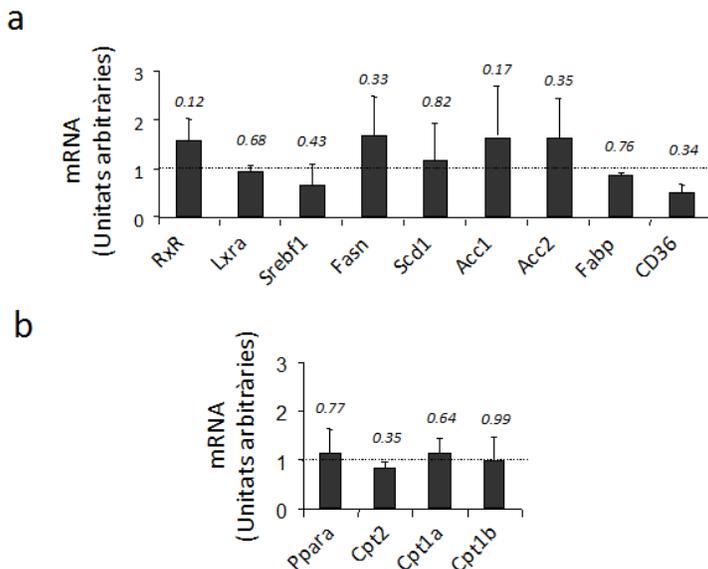
a



b



**Figura 13. Síntesi i oxidació de lípids.** a) La síntesi d'àcids grassos (AG) té lloc al citosol a partir del principal precursor, l'Acetil-CoA, on l'acció de diversos enzims (*Acc1*, *Fasn*, *Scd1*) promou l'elongació de la molècula fins obtenir un àcid gras simple. *Srebp1*, *LxRa* i *RxRa* són factors de transcripció que regulen l'expressió dels diferents enzims. *Fabp* i *Cd36* participen en el transport dels àcids grassos té lloc a partir de precursors. b) En l'oxidació de lípids, els AG provinents dels triglicèrids són oxidats a l'interior de la membrana mitocondrial on s'allibera Acetil-CoA, (que entrarà a la cadena respiratòria) per l'escurçament de dos carbonis de la molècula d'àcid gras que té lloc en cada cicle. *Ppara* és un factor de transcripció que regula l'expressió de *Cpt1* i *Cpt2*, que participen en la translocació mitocondrial de l'Acetil-CoA.



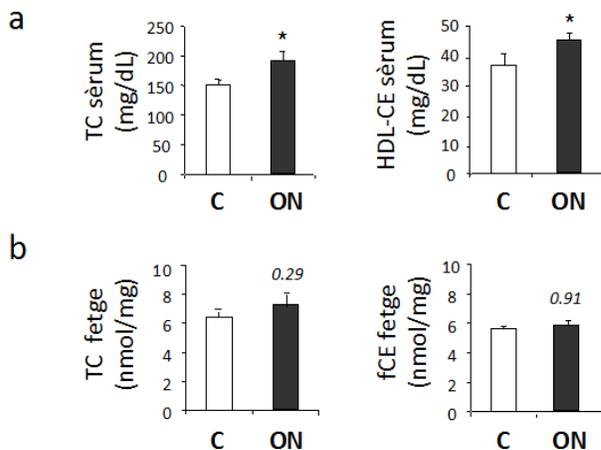
**Figura 14. Anàlisi de factors de regulació i enzims de la síntesi i oxidació de lípids en animals de 4 mesos de vida.** a) Expressió de gens que participen en la síntesi d'àcids grassos. b) Expressió de gens que participen en l'oxidació d'àcids grassos. Valors d'expressió normalitzats per Actina b. Animals dejunats 12h.  $n \geq 6$  animals per grup. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. La línia discontinua representa l'expressió del grup C. Les barres negres representen l'expressió del grup ON. *t Student vs C*, en cursiva p-valor, \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

Com s'indica anteriorment, les lipoproteïnes són responsables del transport d'èsters de colesterol i colesterol. Per aquest motiu es van mesurar els nivells de colesterol tan en sèrum com en fetge.

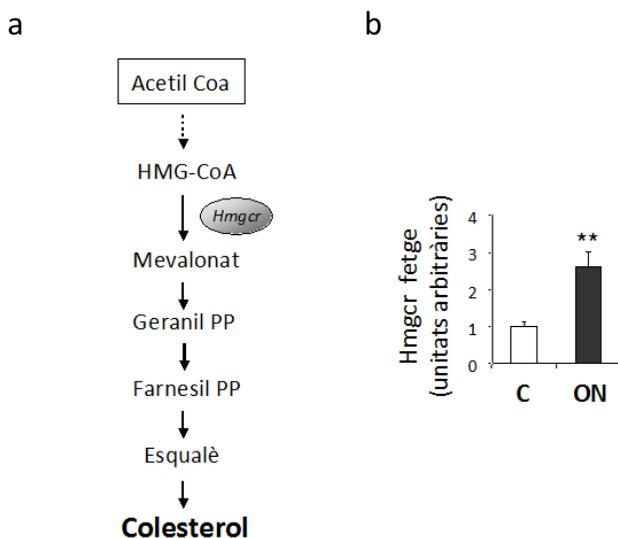
En el grup ON, tant els nivells de colesterol total (TC) com colesterol HDL (present a les lipoproteïnes d'alta densitat, HDL) van augmentar un 22% i 27% respectivament ( $P < 0.05$ ) en relació al grup C (Figura 15a). En canvi, els nivells de colesterol (TC) ( $P = 0.29$ ) i colesterol lliure (fCE) ( $P = 0.91$ ) del fetge eren similars entre el grup ON i el grup C (Figura 15b).



| 1. Caracterització del fenotip ON



**Figura 15. Colesterol en sèrum i fetge en animals adults de 4 mesos de vida.** *a*) Colesterol total (TC) i colesterol HDL (HDL-CE) en sèrum. *b*) Colesterol total (TC) i colesterol lliure (fCE) en fetge. Animals dejunats 12h.  $n \geq 8$  animals per grup. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. *t* Student vs C, en cursiva p-valor, \*  $P \leq 0.05$ .



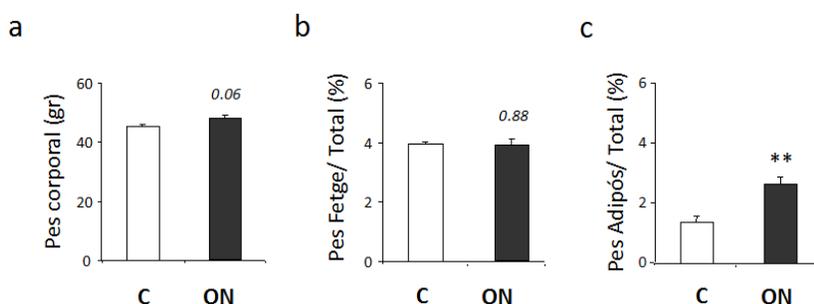
**Figura 16. Síntesi de colesterol en animals de 4 mesos de vida.** *a*) La síntesi de colesterol té lloc al Reticle Endoplasmàtic Llis a partir del precursor Acetil-CoA que es fosforila i pateix una sèrie de reaccions on *Hmgcr* és l'enzim limitant de la via. *b*) Expressió hepàtica de *Hmgcr* normalitzada per Actina *b*. Animals dejunats 12h.  $n \geq 6$  animals per grup. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. *t* Student vs C, \*\*  $P \leq 0.01$ .

A continuació es va avaluar la síntesi de colesterol al fetge a través de l'activitat transcripcional de Hmgcr (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase), principal gen a la via de síntesi de colesterol (Figura 10). Es va observar un augment ( $P < 0.01$ ) en l'expressió de Hmgcr en el grup ON (Figura 16).

## ESTUDI HISTOLÒGIC I FUNCIONAL DEL TEIXIT ADIPÓS

Durant el sacrifici dels animals es van pesar els diferents teixits. Els animals del grup ON eren més grans degut, principalment, a que tenien major proporció de teixit adipós (Figura 17). És a dir, acumulaven greixos.

A continuació es va realitzar un estudi histològic del teixit adipós, per conèixer si l'acumulació de greixos al teixit adipós era degut a una hipertròfia (capacitat d'emmagatzemar TAG als adipòcits) o a una hiperplàsia (major nombre d'adipòcits).



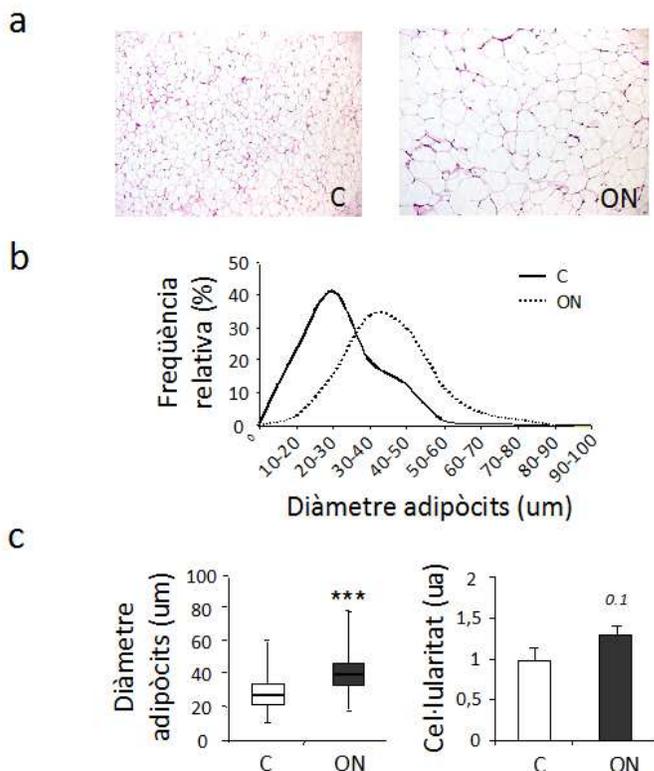
**Figura 17. Pes corporal i dels teixits en animals de 4 mesos de vida.** a) Pes corporal total. b) Pes del fetge en relació al pes corporal total. c) Pes del teixit adipós en relació al pes corporal total. Animals dejunats 12h.  $n \geq 10$  animals per grup. Els resultats s'expressen com a %  $\pm$  SEM. *t Student vs C*, en cursiva p-valor, \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

En els talls histològics es va observar que els adipòcits del grup ON eren més grans que els del grup C (Figura 18a). Aquesta dada es va confirmar amb l'anàlisi de la distribució de la freqüència relativa del diàmetre dels adipòcits. En el grup ON hi havia adipòcits amb un diàmetre més gran que els observats en grup C. En conjunt, els diàmetre dels adipòcits del grup ON era superior que en el grup C ( $P < 0.001$ ) en un context on el nombre d'adipòcits del teixit era similar en ambdós grups (Figura 18b). Per tant, l'augment de massa de teixit adipós s'explica per una hipertròfia del teixit.

Per confirmar les observacions histològiques sobre la hipertròfia del teixit adipós, és a dir que el nombre d'adipòcits entre els grups ON i C era similar, es va estudiar l'expressió dels principals factors de transcripció que estimulen l'adipogènesi, en el cas de PPARg (peroxisome proliferator- activated receptor g) i CEBPa (CCAAT/enhancer binding protein), o

## | 1. Caracterització del fenotip ON

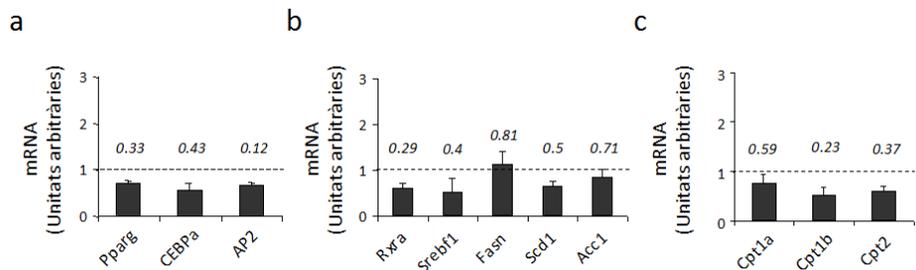
s'expressen principalment durant la diferenciació del adipòcits, com AP2 (activating enhancer binding protein 2), que participa en el transport d'àcids grassos. L'expressió d'aquests gens es trobava lleugerament disminuïda en el grup ON, però en cap cas de forma significativa (Figura 19a). Per tant, l'augment d'adipositat als animals ON no s'explica per un augment de l'adipogènesi.



**Figura 18. Estudi histològic del teixit adipós en animals de 4 mesos de vida.** a) Adipòcits tenyits amb hematoxilina-eosina. Seccions de 5 µm. Imatge 20x. b) Distribució de la freqüència relativa dels adipòcits segons el seu diàmetre. La línia contínua correspon al grup control, la discontinua al grup ON. c) Nombre d'adipòcits per secció amb resultats expressats com a mitjana ± SEM. L'error negatiu representa el mínim, l'error positiu el màxim. La part inferior de la caixa correspon al primer quartil, mentre que la part superior al tercer quartil. La mediana és la línia que divideix la caixa. Tots els càlculs són a partir dels adipòcits continguts en la diagonal més llarga de cada secció en 8-10 preparacions histològiques de diferents animals. Utilització del programa d'anàlisi d'imatges *Image J* (<https://rsb.info.nih.gov/ij/>). Animals dejunats 12h. n ≥ 8-10 animals per grup. t Student vs C, en cursiva p-valor, \*\*\* P ≤ 0.001.

L'augment del diàmetre dels adipòcits s'explicava, molt probablement, per un augment de l'acumulació de triglicèrids. De la mateixa manera que al fetge, es va mesurar l'activitat transcripcional dels principals gens lipogènics i lipolítics mitjançant RT i qPCR. Es va observar una disminució no significativa en l'expressió dels diferents gens (excepte *Fasn*, que no canviava) (Figura 19b i 19c). Per tant, no hi ha canvis ni en la síntesi ni en l'oxidació de lípids al teixit adipós.

El teixit adipós blanc participa en d'altres funcions a més del metabolisme dels lípids. És responsable de l'alliberació de productes de secreció que intervien en la regulació de la ingesta, despesa energètica, resposta immune i funció vascular. Quan augmenta de mida es torna resistent a la insulina. Existeix una relació important entre l'obesitat, la resistència a la insulina i altres alteracions associades (Ozarda Y, 2012). Secreta substàncies amb acció endopara- i exocrina entre les que destaquen TNF $\alpha$ , IL-6, MCP1 (que contribueixen al caràcter inflamatori de la obesitat), leptina (regula la ingesta i inhibeix la secreció d'insulina), resistina (redueix la secreció d'insulina, indueix resistència) i adiponectina (millora la sensibilitat perifèrica a la insulina).



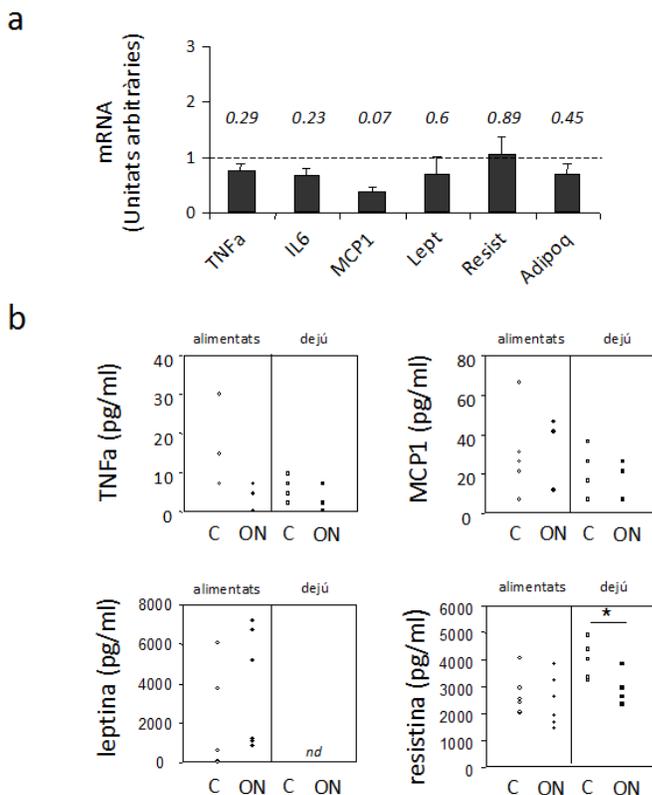
**Figura 19. Anàlisi de factors de regulació de l'adipogènesi i de la síntesi i oxidació de lípida al teixit adipós en animals de 4 mesos de vida.** a) Expressió de factors de transcripció que estimulen l'adipogènesi. b) Expressió de gens que participen en la síntesi d'àcids grassos. c) Expressió de gens que participen en l'oxidació d'àcids grassos. Valors d'expressió normalitzats per Actina. b. Animals dejunats 12h.  $n \geq 6$  animals per grup. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. La línia discontinua representa el l'expressió del grup C. Les barres negres representen l'expressió del grup ON. *t Student vs C*, en cursiva p-valor.

L'augment de pes i la presència de resistència a la insulina dels animals ON entre d'altres característiques, així com la estreta interacció entre les adipoquines i aquestes alteracions, les converteixen en un factor d'estudi clau en el model ON.

En primer lloc es va mesurar l'activitat transcripcional corresponent a les principals substàncies secretades pel teixit adipós. No es van observar canvis significatius en l'expressió dels diferents gens en el grup ON, tot i una tendència a disminuir en comparació al grup control (Figura 20a).

| 1. Caracterització del fenotip ON

En segon lloc, es van mesurar els nivells d'adipoquines en sèrum tant en condicions d'alimentació com dejuni, per conèixer l'activitat secretora que té lloc al teixit adipós. De forma general no es van observar diferències entre els dos grups en cap de les dues condicions, encara que existia una tendència no significativa a una disminució dels nivells d'adipoquines, excepte en el cas de la leptina. La única diferència significativa era en els nivells de resistina en condicions de dejú, que en el grup ON es disminuïen ( $P < 0.05$ ) (Figura 20b).

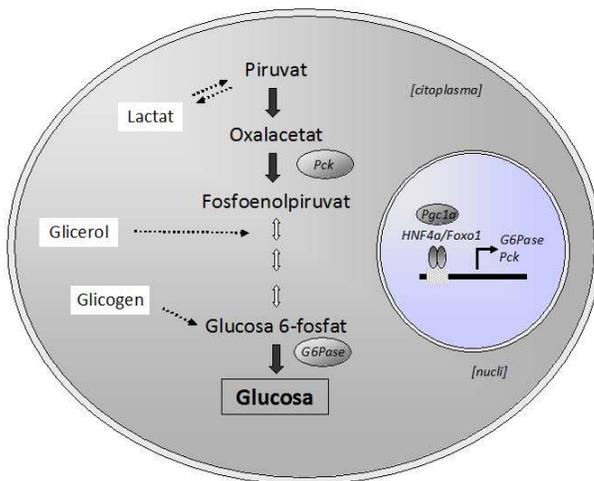


**Figura 20. Anàlisi d'expressió i del contingut d'adipoquines secretades pel teixit adipós en animals de 4 mesos de vida.** a) Expressió de les principals adipoquines secretades pel teixit adipós. Valors d'expressió normalitzats per Actina b. Animals dejunats 12h.  $n \geq 6$  animals per grup. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. La línia discontinua representa el l'expressió del grup C. Les barres negres representen l'expressió del grup ON. b) Contingut d'adipoquines en sèrum. Cada punt correspon a un animal. Les rodones representen animals alimentats, mentre que els quadrats corresponen a animals en dejú (12 h).  $n \geq 4-6$  animals per grup. *t Student vs C*, en cursiva p-valor, \* $P \leq 0.05$ .

## 1.2.5 ESTUDI DEL METABOLISME GLUCÍDIC

Una de les primeres característiques en el fenotip dels animals ON va ser l'alteració en els nivells glucosa, que podia ser conseqüència d'una alteració en la sensibilitat a la insulina (Apartat 1.2.3), o bé, de la capacitat de produir glucosa dels animals ON.

Per estimar la capacitat gluconeogènica es va realitzar un test de producció de glucosa a partir de piruvat (Figura 21). Els animals ON van mostrar una major capacitat gluconeogènica en comparació al grup C. Aquest augment era significatiu 60 min després de l'administració del substrat gluconeogènic (piruvat sòdic) (Figura 22a).

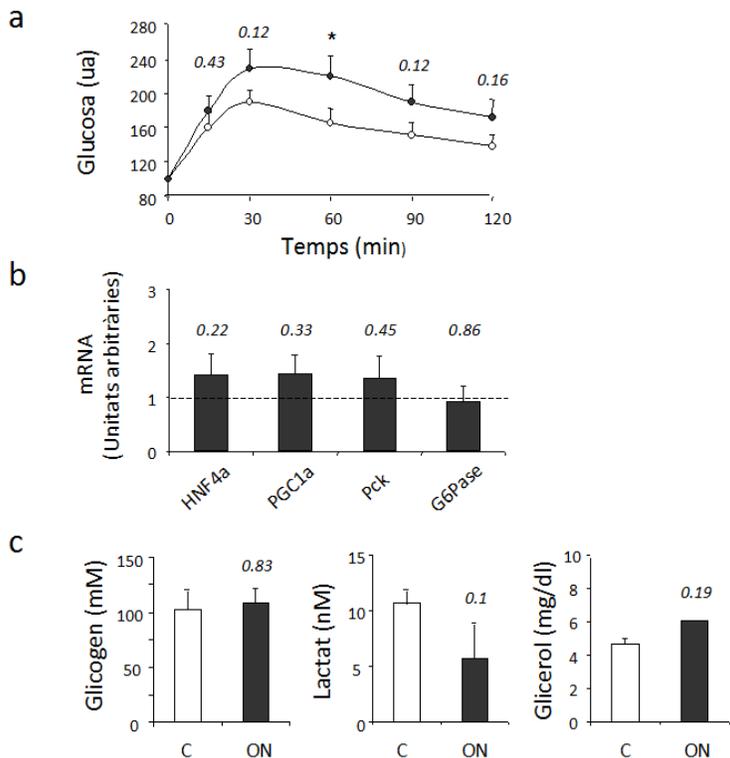


**Figura 21. Gluconeogènesi.** La gluconeogènesi permet la síntesi de glucosa a partir de precursors no glucídics com el lactat, el glicerol i el glicogen. *Pck* i *G6Pase* reaccions irreversibles i exclusives de la gluconeogènesi. *Pgc1α* i *HNF4α* són factors de transcripció que regulen l'expressió de *Pck* i *G6Pase*.

La gluconeogènesi té lloc casi exclusivament al fetge (10% ronyó). Donat l'augment que es va observar en animals ON, a continuació es va avaluar l'activitat transcripcional dels principals gens de la via: fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (*Pck*) i glucosa 6-fosfatasa (*G6Pase*); així com de PPAR gamma coactivador 1 alpha (*PGC1α*) i el factor de transcripció hepàtic nuclear 4 alpha (*HNF4α*), que participen en la regulació del procés. En cap cas es van observar canvis d'expressió gènica en el grup ON respecte el grup C (Figura 22b).

Així mateix es van mesurar els nivells dels principals substrats gluconeogènics: glicogen, lactat i glicerol. No es van observar diferències en els nivells dels substrats entre els animals del grup ON i C (Figura 22c).

| 1. Caracterització del fenotip ON



**Figura 22. Estudi de la capacitat gluconeogènica en animals de 4 mesos de vida.** a) Test de producció de glucosa a partir de piruvat després de l'administració de 2 gr de piruvat sòdic /kg de pes corporal. Les rodones buides corresponen al grup C, mentre que les rodones negres al grup ON.  $n \geq 12$  animals per grup. b) Expressió dels principals factors de transcripció i enzims que participen en la gluconeogènesi. La línia discontinua representa l'expressió del grup C. Les barres negres representen l'expressió del grup ON.  $n \geq 5$  animals per grup. c) Contingut hepàtic (glicogen) i sèric (lactat i glicerol) dels principals substrats gluconeogènics  $n \geq 5$  animals per grup. Tots els estudis són en animals dejunats 12h. Tots els resultats expressats com a mitjana  $\pm$  SEM. *t Student vs C*, en cursiva p-valor, \* $P \leq 0.05$ .

## 1.3 DISCUSSIÓ

Al laboratori s'ha desenvolupat un model murí de sobrenutrició neonatal i creixement accelerat. Els animals sobrenutrits (overnutrition, ON) presenten sobrepès en l'edat adulta, tot i normalitzar la seva ingesta. Per tant l'etapa neonatal esdevé un període crític en el desenvolupament de sobrepès i obesitat, que persisteixen en l'edat adulta independentment de la nutrició. Aquesta observació està en acord amb múltiples estudis que demostren que la sobrenutrició en l'etapa perinatal induïx canvis en el metabolisme energètic que donen lloc a la obesitat (Bulfin LJ, 2011; Plagemann A, 2006; Spencer SJ, 2009; Stefanidis A, 2012). Alhora, la sobrenutrició neonatal produeix alteracions metabòliques. Els animals ON presenten intolerància a la glucosa. Aquest fet reforça 1) les evidències d'estudis fets en humans, on el creixement accelerat durant la infància dona lloc a obesitat infantil i augmenta el risc de diabetes en l'adult (Lucas A, 2010); i 2) múltiples observacions d'estudis fets en rates on la sobrenutrició i el creixement accelerat promouen el desenvolupament de diabetes en l'adult (Boullu-ciocca S, 2005; Plagemann A, 1992).

Probablement, en els animals ON la intolerància és deu a un problema en l'acció de la insulina més que a un problema de la cèl·lula beta, ja que s'observa un augment de l'índex HOMA-IR, mentre que l'índex HOMA-b no presenta canvis. L'índex HOMA-b té en compte la secreció d'insulina en resposta als nivells de glucosa en sang. L'absència de diferències entre en l'índex HOMA-b vol dir que la cèl·lula beta és capaç de respondre adequadament tan en animals C com ON. En el model ON, índex HOMA-b similars, és indicatiu de que els animals ON han de secretar més insulina per compensar la hiperglucèmia. A partir de les observacions fetes durant l'ipGTT, sembla que els animals ON presenten un problema de sensibilitat a la insulina, més que de secreció. És necessari un assaig addicional de sensibilitat a la insulina en els teixits perifèrics per aprofundir a nivell molecular els motius d'aquesta resistència que s'observa.

En primer lloc, l'augment significatiu Akt i Gsk3 en el grup C en tots els teixits confirma que es tracta de dos bones dianes per a estudiar la via de senyalització de la insulina. Val a dir, que en el cas del múscul, l'activació de Gsk3 no arriba al límit de significació ( $P=0.06$ ). Aquest fet es pot explicar perquè al múscul, la síntesi de glicogen estimulada per insulina no depèn únicament de la funció de Gsk3, sinó que és el resultat de la contribució relativa de dos esdeveniments: 1) la desfosforilació covalent de la Glicogen Sintasa (GS) per part de Gsk3, i 2) l'activació al·lostèrica per part de la glucosa 6-fosfat (G6P). De fet, *in vivo*, la insulina juga un paper clau principalment en aquest segon esdeveniment (Bouskila M, 2007; Roach PJ, 2002). Per tant, al múscul és més difícil veure l'efecte de la insulina sobre Gsk3, ja que no és un pas limitant en la funció final, que és la síntesi de glicogen. Tot i això, al laboratori es va escollir igualment Gsk3 perquè és una diana directa d'Akt (del qual s'obté una molt bona activació), s'observava activació de Gsk3 (tot i que no tan pronunciada com en altres teixits) i per seguir el mateix patró d'estudi que en els altres teixits i així fer-ne més fàcil la interpretació.

La presència de resistència hepàtica a la insulina en animals ON es fa evident perquè l'activació de la via de senyalització de la insulina en resposta a una mateixa quantitat d'insulina és molt menor en els animals ON que en els animals C, tan en els nivells de pAkt



## | 1. Caracterització del fenotip ON

(que en presència de insulina no augmenta de forma significativa) com en la seva diana Gsk3. A més, en ambdós casos, l'increment de les formes fosforilades (pròpies de l'activació de la via) en animals ON és menys de la meitat que en animals C.

En el teixit adipós, també s'observa un defecte en l'activació de la via de senyalització d'insulina en animals ON, ja que pAkt aconsegueix un augment significatiu, tot i que menor (per tant hi ha alguna alteració) però Gsk3 no respon de forma apropiada.

Per últim, al múscul la sensibilitat a la insulina és inclús millor en animals ON que en animals C. Tal i com s'ha comentat en aquest capítol, la resposta de Gsk3 a Akt és petita tant en animals C com ON en comparació als altres teixits degut a la contribució relativa de Gsk3 en la síntesi de glicogen al fetge. El fet que l'increment de Gsk3 sigui similar en ambdós grups i la bona resposta prèvia de Akt, són indicatius que no hi ha resistència a nivell muscular. De fet, la millor resposta de Akt a insulina podria ser un efecte compensatori del múscul a la resistència progressiva dels altres dos teixits estudiats.

A més, tant al fetge com al teixit adipós s'observa una hiperactivació basal de la via. És a dir, tot i no haver-hi un estímul extern (insulina) que indueix l'activació de la via, els nivells de pAkt en animals sense insulina són superiors en animals ON respecte els C.

L'augment basal de fosforilació a fetge i teixit adipós de ratolins ON es pot explicar pel fet que aquests individus presenten hiperinsulinèmia en dejú. Per tant, la exposició a nivells elevats crònics d'insulina poden causar aquest augment de fosforilació d'Akt i Gsk3b fins i tot en absència de l'estímul suprafisiològic de la insulina.

D'altra banda, durant l'ipGTT, els animals ON secreten una major quantitat d'insulina que els animals C, possiblement com a conseqüència de la resistència perifèrica en la que es troben (Del Prato S, 2002). Per tal de determinar la funcionalitat de la cèl·lula  $\beta$  i la seva contribució a la tolerància a la insulina es va assajar la seva capacitat secretora *in vitro*. S'observa que la cèl·lula  $\beta$  de ratolins ON presenta certa inflexibilitat a la glucosa, caracteritzada per una secreció desproporcionada a concentracions baixes (2.8 mM) mentre que a concentracions elevades (16.7 mM) encara és capaç de mantenir la secreció, comparable als illots del grup C. Per tant, en aquest punt la cèl·lula  $\beta$  ja presenta una certa alteració en la secreció d'insulina en resposta a glucosa. Aquest perfil de secreció es típic d'illots adaptats a condicions de glucotoxicitat (degut a elevades glucèmies) i/o lipotoxicitat (elevats nivells de triglicèrids) i es tracta d'un patró de comportament peculiar de la cèl·lula  $\beta$  pre-diabètica *in vitro* (Gerich JE, 2002; Hosokawa Y, 1996, Newgard CB, 2002; Prentki M, 2012).

Pel que fa a la secreció d'insulina en condicions fisiològiques basals o de dejú, la cèl·lula  $\beta$  augmenta la secreció d'insulina a fi de mantenir la normoglucèmia en un context on no hi ha diferències en la massa de cèl·lula  $\beta$  del pàncrees. La hiperinsulinèmia basal podria ser una adaptació funcional per part de la cèl·lula  $\beta$  a la resistència a la insulina que s'observa. Aquesta característica és típica d'individus obesos no diabètics i es considera un primer pas en el desenvolupament d'estats patològics (Del Prato S, 2002; Gonzalez A, 2013; Quan W, 2013; Reaven GM, 2005).

En conclusió, sembla que la cèl·lula  $\beta$  és capaç de respondre funcionalment. En dejú, normalitza la glucèmia mitjançant la hipersecreció d'insulina. En alimentació, tot i augmentar la secreció de insulina s'observa hiperglicèmia degut probablement a la resistència perifèrica a la insulina.

En aquest punt és necessari estudiar quins senyals intracel·lulars inicien la resistència al fetge i al teixit adipós per tal de trobar les vies responsables de l'alteració en la senyalització de la insulina. Factors endocrins (àcids grassos, adipoquines), factors d'inflamació i/o factors intrínsecs (acumulació ectòpica de greixos, estrès oxidatiu, estrès al Reticle Endoplàsmic o alteracions mitocondrials) s'han descrit com a senyals que poden induir resistència a la insulina (Qatanani M, 2007). Encara que algun d'aquests factors pot tenir una paper dominant, pot ser que existeixi una interdependència entre diversos factors que esdevengui responsable de la patofisiologia de la resistència a la insulina.

Pel que fa al metabolisme lipídic, la hiperinsulinèmia i la resistència a la insulina sovint estan associats a dislipèmia. El component més evident de la dislipèmia és l'augment de triglicèrids i àcids grassos lliures que poden recircular cap al fetge donant lloc a l'acumulació hepàtica de triglicèrids. (Avramoglu RK, 2006; Klop B, 2013; Ruotolo G, 2002).

El model ON mostra un augment d'àcids grassos lliures i triglicèrids (sèrum, fetge i múscul), així com de VLDL. En acord a la bibliografia existent, els animals ON utilitzarien els àcids grassos lliures per sintetitzar triglicèrids, que s'acumularien al fetge i formarien les VLDL. Es confirma la implicació del fetge en la producció-export de VLDL mitjançant experiments amb Tyloxapol. El Tyloxapol bloqueja l'activitat lipoproteïna lipasa dels teixits perifèrics. Per tant, després de la seva administració els triglicèrids circulants d'un animal dejunat estan continguts en lipoproteïnes de nova producció, és a dir, VLDL (Levine S, 2007). Els animals ON presenten nivells elevats de TAG 180 min després de l'administració de Tyloxapol, confirmant un augment actiu en la síntesi i/o exportació de VLDL.

Per la síntesi de VLDL s'utilitzen quatre fonts d'àcids grassos: la lipogènesi *de novo*, els dipòsits de triglicèrids del citoplasma, els àcids grassos continguts en les lipoproteïnes i els àcids grassos del plasma. Quantitativament, la lipogènesi *de novo* té una contribució poc important en la síntesi de VLDL (Julius U, 2003). De fet, els animals ON no presenten canvis en l'expressió hepàtica de gens lipogènics ni lipolítics. Així doncs, la síntesi hepàtica de VLDL tindria lloc, molt probablement, degut a un augment del flux d'àcids grassos cap al fetge. L'exportació de VLDL també està sotmès a regulació (Erickson B, 2013). És possible que l'augment de VLDL després de l'administració de Tyloxapol sigui degut a un augment de la síntesi/producció, un augment de l'exportació de VLDL o la combinació d'ambdós processos.

En animals ON adults s'observa hipertrigliceridèmia i resistència a la insulina al fetge. No està clar si la resistència a la insulina és la causant de l'acumulació de triglicèrids al fetge, o si l'augment de triglicèrids per si mateix o bé de metabòlits intermediaris desencadena el desenvolupament hepàtic o sistèmic de resistència a la insulina (Postic C, 2008). Múltiples estudis mostren que una acumulació excessiva de triglicèrids en els hepatòcits es troba altament associada amb la resistència a la insulina (Abdelmalek MF, 2007; Charlton M, 2004; Adams LA, 2007). Altres estudis recents afavoreixen el concepte de l'acumulació intrahepàtica de lípids com a precedent dels estats d'insulinoresistència. Per contra, altres

estudis demostren que els triglicèrids hepàtics per si mateixos no són tòxics i poden tenir un efecte protector davant la lipotoxicitat (Listenberger L, 2003; Yamaguchi K, 2007), suggerint que l'esteatosi hepàtica no està necessàriament associada a la resistència a la insulina (Monetti M, 2007; Rinella ME, 2004). La relació entre ambdós factors en animals ON s'estudia en el capítol següent.

D'altra banda, es coneix que un 25% de la síntesi *de novo* de colesterol té lloc al fetge (la resta es sintetitza a l'intestí, glàndules adrenals o aparell reproductor) a partir d'Acetil-Coa (àcids grassos) o piruvat (provinent de glucosa) (Berg JM, 2002). Els animals ON mostren un augment de la síntesi hepàtica de colesterol que va en acord a l'augment de colesterol en sèrum.

A part de triglicèrids, les VLDL contenen aproximadament un 12% d'esters de colesterol i colesterol. Aquest contingut és menor que el 42% i 36% de corresponent a les LDL i HDL, tot i això, un augment de les VLDL pot resultar en un augment del colesterol total. L'augment de colesterol VLDL és un dels factors contribuents a la formació de plaques aterogèniques i esdevé un risc important de malalties cardiovasculars (Steiner G, 1987; Kuchinskiene Z, 1982; NCEP, 2002).

Amb els experiments realitzats es pot afirmar que s'observa hipercolesterolemia en sèrum, augment de síntesi hepàtica de colesterol i augment de colesterol HDL però no es pot concloure quin és el motiu. Una possible hipòtesi és que als animals ON la disponibilitat de substrats provoqui un augment de la síntesi de colesterol hepàtica i de la producció de VLDL. En l'augment de HDL, no es pot descartar un defecte en el transport revers de colesterol, en el seu metabolisme, en la síntesi o absorció d'àcids biliars o en l'excreció tindria com a raó alternativa a l'acumulació de colesterol HDL (Voshol PJ, 1998; Turner S, 2012). Malauradament no ha estat possible aprofundir en aquest tema al llarg d'aquesta tesi, que en aquest capítol s'ha centrat sobretot en la caracterització general del fenotip ON.

En un terç diferent, els animals ON tenen sobrepès al llarg del disseny experimental (des de les 2 setmanes fins al 4 mesos de vida). Aquest sobrepès s'explica, en part, per un augment de l'adipositat. A nivell histològic els adipòcits dels animals ON són clarament més grans que els controls. Així mateix, el posterior estudi de la distribució del diàmetre dels adipòcits mostra com en els animals ON els adipòcits grans són més freqüents que en animals C, i la mitjana i la mediana dels diàmetres també són superiors. Curiosament, aquest augment del diàmetre dels adipòcits correlaciona amb la resistència a la insulina que s'observa a les 4 setmanes de vida.

Que hi hagi hipertròfia del teixit no impedeix que també hi pugui haver hiperplàsia. En aquest cas, el comptatge d'adipòcits s'ha fet a partir de les mostres histològiques relativitzades al pes del teixit, i sembla evident que el nombre d'adipòcits és similar en ambdós grups i que el motiu principal de l'augment de massa del teixit és la hipertròfia. L'absència de canvis en l'expressió dels factors de transcripció implicats en l'adipogènesi confirma que no hi ha hiperplàsia i per tant, la hipertròfia del teixit adipós és la principal causa del sobrepès.

El teixit adipós és el principal òrgan d'emmagatzematge de triglicèrids. En animals ON, l'augment de massa del teixit adipós podria indicar un augment de la lipogènesi. Per contra,

no s'observen canvis d'expressió en els principals gens lipogènics. Tampoc s'observen canvis d'expressió en els gens lipolítics. Per tant, sembla que no hi ha una variació en l'activitat del teixit adipós en un context d'hipertròfia. Cal tenir en compte que es tracta d'un teixit adipós resistent a la insulina, de manera que la hiperinsulinèmia no és capaç d'estimular la lipogènesi del teixit adipós a fi emmagatzemar part dels triglicèrids circulants.

L'augment de massa del teixit adipós en un context on la lipogènesi i la lipòlisi no canvia, fa pensar que l'acumulació de greixos ha tingut lloc en un altre moment, i per tant es dona una situació de programació del teixit. És a dir, en l'etapa postnatal, que és quan té lloc la sobrenutrició, el teixit adipós acumula greixos i aquesta situació esdevé irreversible tot i normalitzar la ingesta en l'edat adulta. Aquesta és una situació descrita en la bibliografia en altres models animals sobrenutrició de les cries o materna i/o desnutrició, en rata i en ratolí (Davidowa H, 2007; Martin-Gronert MS, 2013; Plagemann A, 1999; Samuelsson AM 2008).

En un context d'obesitat i resistència a la insulina dels animals ON, la secreció d'adipoquines per part del teixit adipós pren importància en la biologia del fenotip ON, ja que moltes adipoquines participen en processos inflamatoris. Amb la obesitat la secreció d'adipoquines pot veure's alterada i provoca inflamació que s'associa a diverses alteracions metabòliques, entre les quals es troba la resistència a la insulina. (Stofkova A, 2009; Ouchi N, 2011; Ozarda Y, 2012). En els animals ON no s'observen canvis d'expressió ni en els nivells sèrics de les principals adipoquines. Per tant, segons les observacions en animals ON de 4 mesos de vida, es descarta la inflamació com a motiu desencadenant de la resistència a la insulina.

Pel que fa al metabolisme glucídic, la gluconeogènesi és un procés que té lloc gairebé exclusivament al fetge (10% als ronyons). En situacions de dejú és clau en l'obtenció de glucosa a partir de diversos substrats com el glicogen hepàtic, el lactat del múscul, el glicerol resultant del teixit adipós o diversos aminoàcids (Girard J, 2006).

La insulina té un efecte inhibidor sobre la gluconeogènesi, que pot ser directe o indirecte. L'efecte directe és el que té lloc sobre el fetge. L'efecte indirecte l'exerceix sobre la secreció de glucagó, els canvis neurals i la reducció dels substrats o precursors gluconeogènics al fetge (Girard J, 2006). Existeix una gran controvèrsia sobre quin és l'efecte dominant. Experiments fets en ratolins amb problemes al receptor d'insulina indiquen que l'efecte directe predomina sobre el indirecte (Cherrington A, 2002), mentre que experiments fets en gossos diuen el contrari (Fisher SJ, 2003).

En animals ON en dejú l'expressió dels principals gens gluconeogènics del fetge es mostra inalterada. A més no s'observa un augment dels principals substrats gluconeogènics que puguin estimular la síntesi de glucosa. Sembla que en animals ON en dejú, la hipersecreció de la cèl·lula beta seria conseqüència de la resistència a la insulina. L'efecte directe de la insulina sobre la gluconeogènesi inhibiria l'expressió hepàtica dels principals gens de la via, i l'efecte indirecte mantindria els nivells normals dels substrats gluconeogènics, ja no s'observen canvis en els nivells de glicogen, lactat ni glicerol. Així doncs, sembla que en última instància la hiperinsulinèmia aconseguiria el control de la normoglicèmia en dejú que s'observa en animals ON, en part, a través del control de la gluconeogènesi, tot i la resistència a la insulina.

## | 1. Caracterització del fenotip ON

Ara bé, davant d'una entrada gran de substrat, com és el piruvat en l'assaig fisiològic de producció de glucosa a partir de piruvat sòdic, els animals ON no són capaços de inhibir la gluconeogènesi. L'efecte indirecte de la insulina perd importància, ja que per molt que s'inhibeixi la producció de substrats, el piruvat arriba des d'una font externa. L'efecte directe no és suficient degut a la resistència hepàtica. Això resulta en un augment de la producció de glucosa, tal i com s'observa en l'assaig de piruvat sòdic. Per tant, l'augment de la gluconeogènesi com a conseqüència de la resistència a la insulina, és un factor que contribueix, en part, a la hiperglucèmia que s'observa en animals ON alimentats.

En resum, la caracterització del fenotip ON permet concloure que la sobrenutrició postnatal dona lloc en l'etapa adulta al desenvolupament de trets característics de la Síndrome Metabòlica, tals com

- intolerància a la glucosa
- hiperinsulinèmia
- resistència a la insulina (a nivell hepàtic i del teixit adipós)
- hipertrigliceridèmia
- hipercolesterolèmia
- augment de la gluconeogènesi (durant una càrrega de piruvat)

És imprescindible tenir en comte que en aquest capítol la caracterització del fenotip ON es realitza en animals adults, de manera que és possible observar canvis i alteracions, però és difícil descriure com s'han desencadenat. Per fer-ho és necessari estudiar els animals ON en diversos moments de la seva vida, o si més no, és necessari estudiar el metabolisme dels animals ON durant l'etapa postnatal, que és quan té lloc la sobrenutrició. Aquest és l'objectiu del següent capítol.

## 2. PROGRAMACIÓ POSTNATAL DEL FENOTIP ON



## 2.1 INTRODUCCIÓ

Nombrosos estudis fets en models experimentals i corroborats en humans (veure Apartat 2 de la introducció) demostren una interrelació entre la nutrició postnatal, el patró de creixement durant la infància i les alteracions metabòliques que s'observen en l'edat adulta (Neu J, 2007). Aquesta fenomen es clau en determinar la salut de l'individu al llarg de la vida.

De fet, aquestes observacions es recullen en la hipòtesi, ja descrita, de l'Origen durant el Desenvolupament de Malalties de l'Adult (Developmental Origins of Health and Disease, DOHaD), que proposa el *programming* o efecte permanent de les condicions primerenques com a influència en el creixement i metabolisme en l'edat adulta (Lucas A, 1991; Gluckman P, 2006; Wang X, 2013).

Aquesta definició s'ajusta al fenotip que s'observa en el model ON del laboratori, on s'indueix una alteració nutricional durant l'etapa postnatal (des del naixement fins al deslletament) que influeix en el metabolisme de l'adult, on els animals desenvolupen hipertriglicèridèmia, hiperinsulinèmia, intolerància a la glucosa i resistència a la insulina.

Sembla ser, doncs, que en etapes primerenques dels animals ON existeix una programació o plasticitat del desenvolupament que dona lloc al fenotip que s'observa en l'adult. En aquest capítol s'estudien els mecanismes que tenen lloc durant les primeres setmanes de vida i que participen en aquesta programació. En resum, contribuir al coneixement sobre quins canvis indueix la sobrenutrició en l'etapa primerenca dels animals ON.

Per fer-ho, es van reproduir durant les primeres setmanes de vida, molts dels experiments i assaigs realitzats en animals adults, centrats sobretot en l'aparició de resistència a la insulina i les alteracions en el metabolisme lipídic. El principal objectiu era conèixer quines alteracions observades en els animals ON adults ja es trobaven presents durant les primeres setmanes de vida.





## 2.2 RESULTATS

### 2.2.1 GLUCÈMIA I TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA

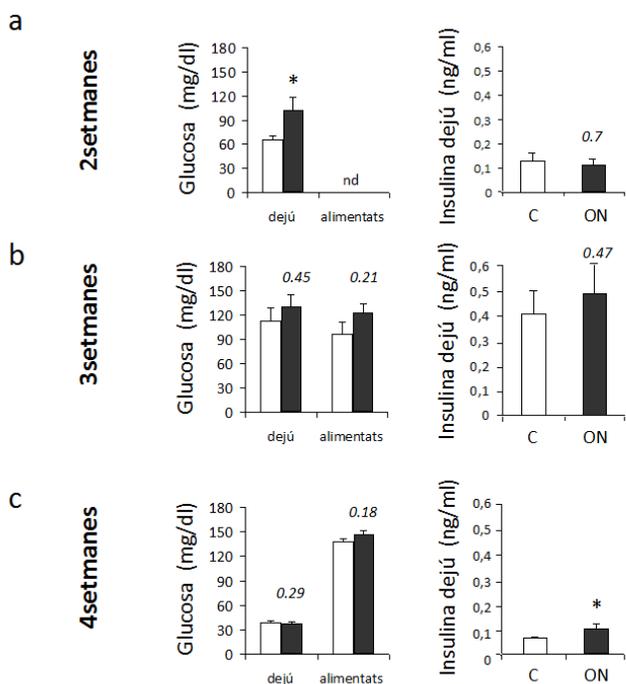
Es van realitzar mesures de glucèmia en animals de 2, 3 i 4 setmanes de vida tant en condicions d'alimentació com dejú. El dejú dels animals de 2 i 3 setmanes va ser de 4h, per evitar altres conseqüències metabòliques d'un dejú prolongat. En animals de 4 setmanes de vida el dejú va ser de 12-16h, igual que en animals adults.

Els ratolins ON de 2 setmanes de vida ja presentaven nivells de glucosa en dejú més elevats ( $P < 0.05$ ) que el grup C, mentre que els nivells d'insulina eren similars en ambdós grups ( $P = 0.7$ ) (Figura 23a).

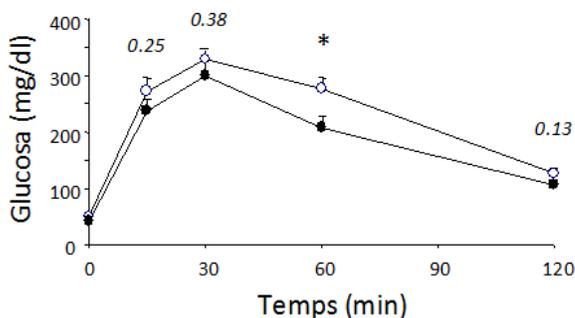
A les 3 setmanes de vida, els nivells de glucosa dels animals ON eren més elevats, encara que de forma no significativa, tant en condicions de dejú ( $P = 0.45$ ) com d'alimentació ( $P = 0.21$ ). Els nivells d'insulina eren lleugerament més alts ( $P = 0.47$ ) en el grup ON que en el grup C (Figura 23b).

A les 4 setmanes de vida els animals ON dejunats tenien nivells de glucosa lleugerament inferiors que el grup C ( $P = 0.29$ ), mentre que els animals ON alimentats tenien nivells de glucosa més elevats que el grup C encara que de forma no significativa ( $P = 0.18$ ). Curiosament, la insulinèmia en dejú augmentava ( $P < 0.05$ ) en animals ON (Figura 23c).

Per avaluar la tolerància a la glucosa en etapes primerenques es va realitzar un ipGTT administrant 2 gr de glucosa /kg de pes corporal a ratolins de 4 setmanes de vida. Els animals del grup ON van respondre millor al bolus de glucosa que el grup C, encara que els resultats sol van ser significatius a 60 min ( $P < 0.05$ ) (Figura 24).



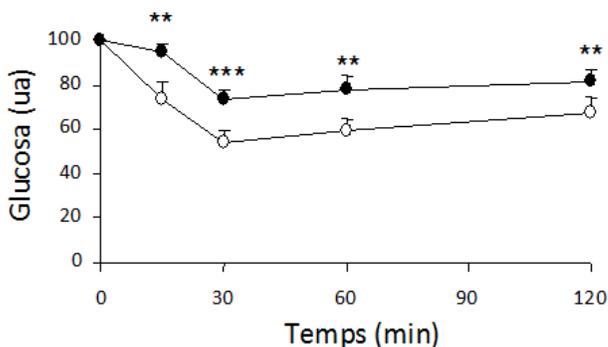
**Figura 23. Glucosa i insulina en sèrum durant les primeres setmanes de vida.** a) 2 setmanes de vida, dejú de 4 h per evitar conseqüències metabòliques. b) 3 setmanes de vida, dejú de 4 h per evitar conseqüències metabòliques. c) 4 setmanes de vida, dejú de 12 h.  $n \geq 10$  animals per grup. Resultats expressats com mitjana  $\pm$  SEM. *t Student vs C*, en cursiva p-valor, \*  $P \leq 0.05$ .



**Figura 24. Tolerància a la glucosa en animals de 4 setmanes de vida.** ipGTT, 2 gr glucosa /kg pes corporal). Les rodones buides corresponen al grup C, mentre que les rodones negres al grup ON. Animals dejunats 12 h.  $n \geq 20$  animals per grup. Resultats expressats com mitjana  $\pm$  SEM. *t Student vs C*: en cursiva p-valor \*  $P \leq 0.05$ .

## 2.2.2. SENSIBILITAT A LA INSULINA

Per avaluar la sensibilitat a la insulina es va realitzar un test intraperitoneal de tolerància a la insulina (ipITT) mitjançant l'administració de 1 U insulina /animal (Humalog) en animals de 4 setmanes de vida. En comparació al grup C, els animals ON mantenien els nivells de glucosa elevats ( $P < 0.01$ ) al llarg de tot el test (Figura 25). Per tant, a les 4 setmanes de vida, els animals del grup ON ja presenten resistència a la insulina.



**Figura 25. Tolerància a la insulina en animals de 4 setmanes d'edat.** ipITT, 1 U insulina /animal). Les rodones buides corresponen al grup C, mentre que les rodones negres al grup ON. Animals dejunats 4 h.  $n \geq 20$  animals per grup. Resultats expressats com mitjana  $\pm$  SEM. *t Student vs C*: \*  $P \leq 0.05$ , \*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

En animals de 4 setmanes, es va repetir l'assaig fisiològic de sensibilitat a la insulina que es va fer en animals adults, a fi de confirmar la resistència a la insulina i determinar com responien els principals teixits sensibles. Igual que en animals adults, es va estudiar l'activació de les principals proteïnes de la cascada de senyalització de la insulina (Akt i Gsk3) a través de la inducció de la seva fosforilació.

Es van realitzar *western blots* en fetge, teixit adipós i múscul, amb anticossos per a les diferents proteïnes, tant en la seva forma fosforilada (pAkt i pGsk3), no fosforilada (Akt i Gsk3) i l'Actina b, com a control intern (Figura 26a).

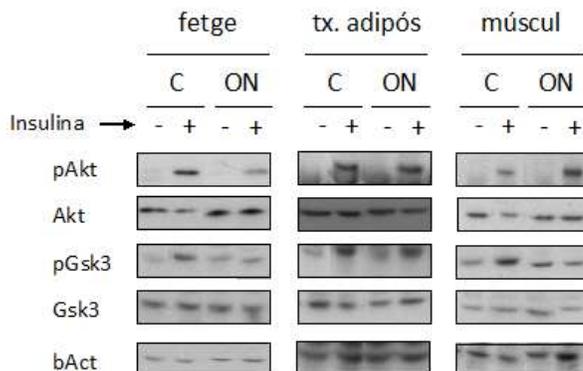
Al fetge es va observar un augment de pAkt de 29x en el grup C ( $P < 0.05$ ) i 3.2x en el grup ON ( $P = 0.12$ ). Per tant, els animals ON no van ser capaços d'activar la via de senyalització d'insulina igual que els animals C. L'activació de pAkt es va traduir en un augment de 1.7x de pGsk3 en el grup C ( $P = 0.2$ ), mentre que en el grup ON l'activació no significativa de pAkt va suposar un augment de 1.3x en pGsk3 ( $P = 0.13$ ) (Figura 26b). Per tant, existeix resistència hepàtica a la insulina en els animals ON de 4 setmanes de vida, sobretot en la primera part de la via.

Al teixit adipós, el grup C va augmentar 12x els nivells de pAkt ( $P < 0.01$ ) mentre que en el grup ON la resposta va ser molt menor, 3.8x, sense arribar a la significació. En el cas de

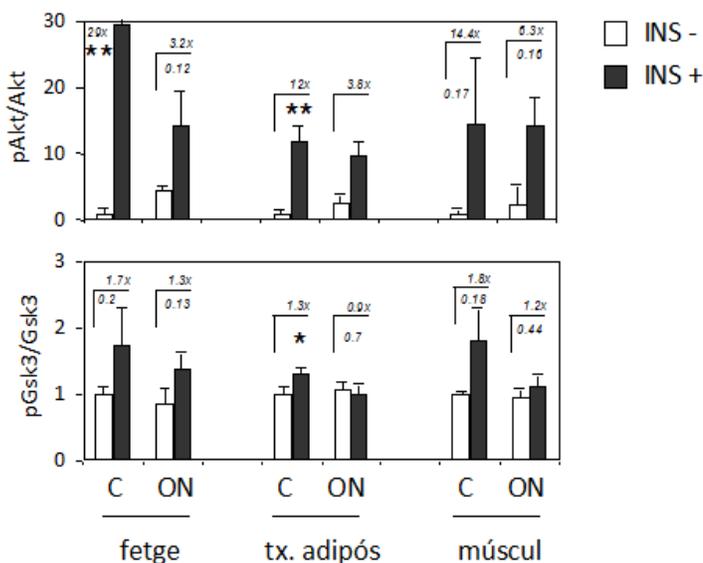
| 2. Programació postnatal del fenotip ON

pGsk3, en el grup C va augmentar 1.3x ( $P < 0.05$ ), mentre que en el grup ON els nivells de pGsk3 no tan sols no augmentaven sinó que inclús van disminuir 0.9x (Figura 26b). Per tant, el teixit adipós dels animals ON de 4 setmanes de vida també presenta resistència a la insulina.

a



b



**Figura 26. Assaig de sensibilitat perifèrica a la insulina en animals de 4 mesos de vida.** Els animals reben 1 U /insulina a través de l'aorta. S'extreuen els teixits i es mesura l'activació de les principals proteïnes de la via de la insulina. *a)* Resultats de *western blot* de les diferents proteïnes en la seva forma fosforilada i sense fosforilar. S'utilitza Actina b (bAct) com a control intern. *b)* Mesura de la fosforilació d'Akt i Gsk3 en fetge, tx. adipós i múscul. Animals dejunats 12 h.  $n \geq 6$  animals per grup. Sobre la barra i en cursiva s'expressa la relació ON/C. Sota la barra s'expressa el valor de P segons *t Student* vs C, \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ .

Al múscul del grup C, pAkt va augmentar 14.4x sense ser significatiu ( $P=0.17$ ), degut probablement, a la dispersió dels resultats. En el grup ON, l'augment de pAkt va ser menor, 6.3x i tampoc va ser significatiu ( $P=0.16$ ). D'altra banda, pGsk3 augmentava 1.6x en el grup C ( $P=0.18$ ) i 1.2x en el grup ON ( $P=0.44$ ), sense ser significatiu en cap dels dos casos, de nou per la dispersió en els resultats (Figura 26b). Així doncs, a partir dels resultats observats, el múscul dels animals ON de 4 setmanes de vida respon a la insulina de manera similar als animals C i per tant, no mostra senyals de resistència.

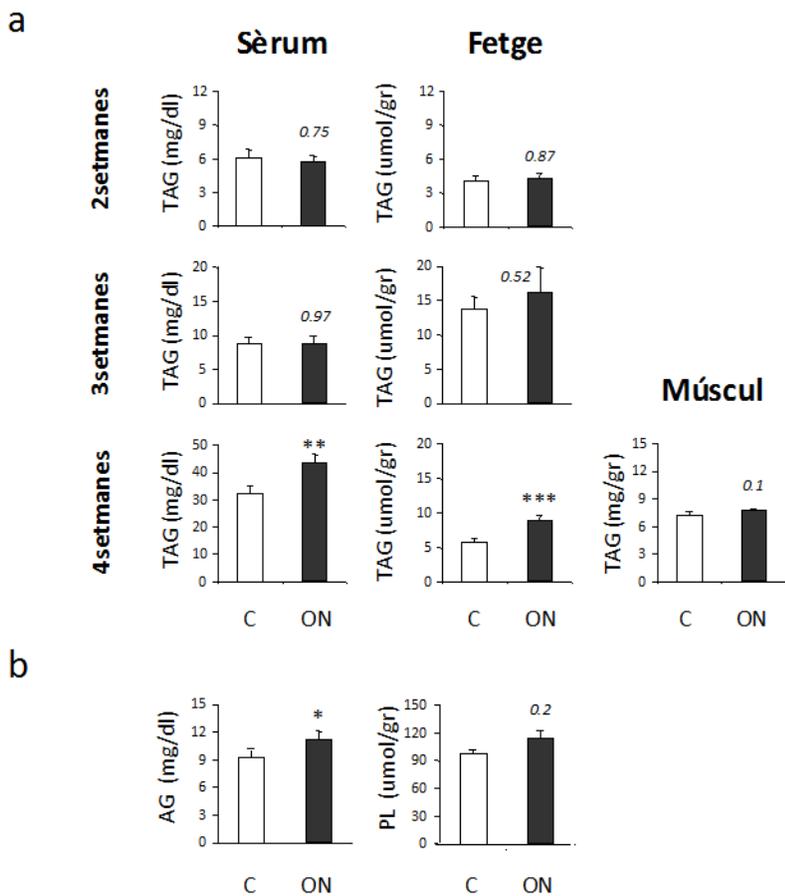
Cal fer notable l'augment de pAkt en el grup ON- en comparació al grup C- (Figura 26b). Aquests alts nivells de fosforilació d'Akt en situació de no estimulació correlacionen amb els resultats d'insulinèmia en sèrum a 4 setmanes de vida (Figura 23c) i com s'ha descrit en el capítol anterior, es mantenen en animals adults.

### 2.2.3 ESTUDI DEL METABOLISME LIPÍDIC

Es van estudiar els nivells de triglicèrids en les primeres setmanes de vida a fi d'esbrinar si la hipertriglicèridèmia en animals adults es desenvolupava durant l'etapa postnatal. A les 2 i 3 setmanes de vida, els triglicèrids en sèrum del grup ON eren similars al grup C. Es va observar un augment dels nivells de triglicèrids per primera vegada a les 4 setmanes de vida ( $P<0.01$ ) (Figura 27a). Així mateix, en aquests animals també augmentaven els àcids grassos lliures ( $P<0.05$ ) (Figura 27b).

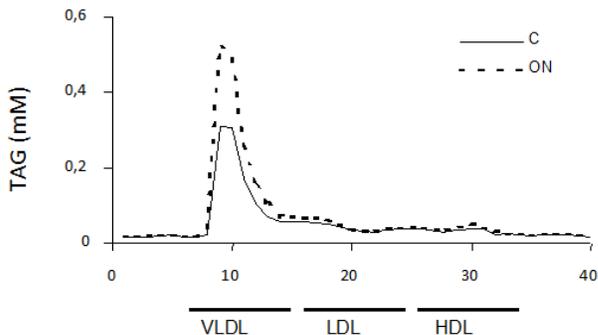
En el fetge dels animals ON es va observar hipertriglicèridèmia per primera vegada a les 4 setmanes de vida ( $P<0.01$ ) (Figura 27a) en un context on els nivells de fosfolípids al fetge eren similars al grup C (Figura 27b). Per últim, en aquests animals no es van observar canvis en els nivells de triglicèrids al múscul (Figura 27a).

Donat que el fetge és un teixit protagonista en la síntesi de lipoproteïnes, i que s'observa un augment de triglicèrids a les 4 setmanes de vida, es va estudiar el metabolisme de les lipoproteïnes. Es va estudiar el perfil de lipoproteïnes mitjançant cromatografia líquida de gel filtració (*fast protein liquid chromatography, FPLC*), que és una tècnica més acurada que l'assaig de Tyloxapol realitzat en animals adults, ja que la mesura es fa directament sobre la mostra de sèrum.



**Figura 27. Contingut de triglicèrids (TAG), àcids grassos (AG) i fosfolípids (PL) en animals de 4 setmanes de vida. a)** Contingut de triglicèrids en sèrum, fetge i múscul en animals de 2 (dejú 4 h,  $n \geq 6$ ) 3 (dejú 4 h  $n \geq 6$ ) i 4 (dejú 12 h,  $n \geq 10$ ) setmanes de vida. **b)** Contingut d'àcids grassos en sèrum i fosfolípids en fetge en animals de 4 setmanes de vida. Animals dejunat 12 h. tots els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. *t Student vs C*, en cursiva p-valor, \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

Es va observar un clar augment de triglicèrids en les fraccions corresponents a les VLDL en el grup ON de 4 setmanes de vida, mentre que els valors corresponents a LDL i HDL van ser similars al grup C (Figura 28).

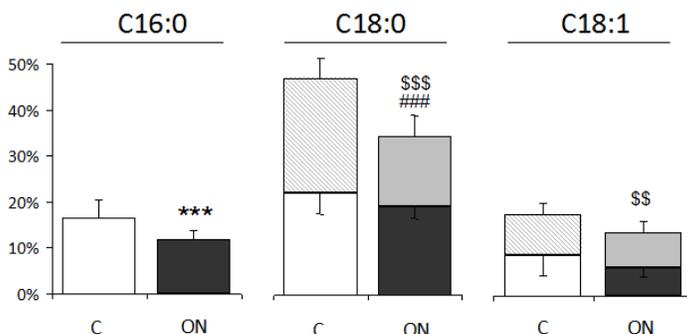


**Figura 28. Perfil de triglicèrids continguts en lipoproteïnes en animals de 4 setmanes de vida.** Cromatografia líquida de gel filtració (FPLC, *fast protein liquid chromatography*) realitzada en mostres de sèrum. La línia contínua correspon al grup C, mentre que la línia discontinua correspon al grup ON. En l'eix de les abscisses es representen les diferents fraccions d'elució. Animals dejunats 12 h.  $n \geq 20$  animals per grup.

Es va dur a terme un estudi de la lipogènesi *de novo* amb isòtops estables mitjançant un anàlisi de distribució de masses (*Mass Isotopomer Distribution Analysis* (MIDA)). Es va mesurar la incorporació de  $^{13}\text{C}$  als àcids grassos continguts en les VLDL en els animals tractats amb  $^{13}\text{C}$ -Acetat. El percentatge d'àcids grassos sintetitzats de nou, així com l'elongació dels ja existents era menor en el grup ON, tant en el cas del palmitat (C18:0) com en l'estearat (C18:0) i l'oleat (C18:1), que són els principals àcids grassos que es troben a les lipoproteïnes ( $P < 0.01$ ) (Figura 29). És a dir, la síntesi de lípids disminueix en el grup ON de 4 setmanes de vida (en un context on les VLDL augmenten).



## | 2. Programació postnatal del fenotip ON



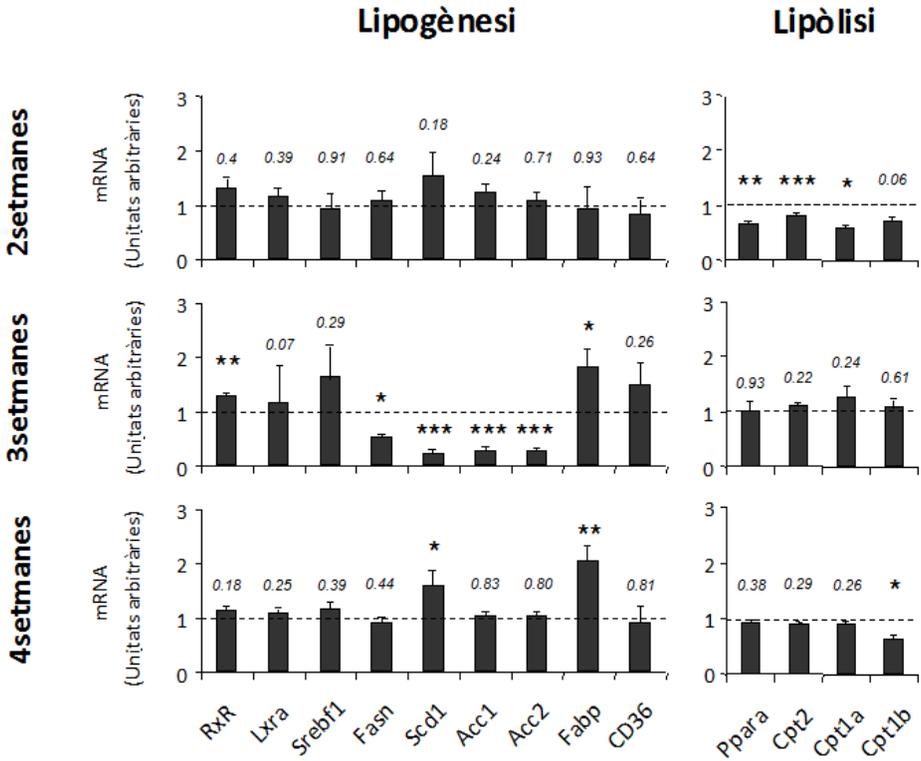
**Figura 29. Lipogènesi *de novo* en animals de 4 setmanes de vida.** La mesura de la lipogènesi *de novo* es du a terme mitjançant la incorporació de  $^{13}\text{C}$  als àcids grassos continguts en les VLDL dels animals tractats amb 10 mg  $^{13}\text{C}$ -Acetat /gr d'aigua durant 96h. C16:0 = Palmitat; C18:0 = Estearat; C18:1 = Oleat. Es representa tan la síntesi fraccional (barres blanques al grup C i barres gris fosc al grup ON) com l'elongació de la cadena (barres rallades al grup C i barres gris clar al grup ON). Càlculs mitjançant anàlisi MIDA (Mass Isotopomer Distribution Analysis). Animals dejunats 12 h.  $n \geq 10$  animals per grup. *t Student* vs C: Síntesi fraccional \*\*\*  $P \leq 0.001$ ; Elongació de la cadena ###  $P \leq 0.001$ ; Total \$\$  $P \leq 0.01$ ; \$\$\$  $P \leq 0.001$ .

A continuació, igual que en el cas del animals adults, es va estudiar l'expressió al fetge de gens lipogènics i lipolítics en animals de 2, 3 i 4 setmanes de vida mitjançant qPCR (Figura 13 a i b).

A les 2 setmanes de vida, l'expressió dels gens lipogènics era similar entre ambdós grups, mentre que l'expressió dels gens lipolítics va disminuir en el grup ON, amb diferent grau de significació (de  $P=0.06$  a  $P<0.001$ ) (Figura 30).

A les 3 setmanes de vida, alguns dels gens lipogènics van disminuir la seva expressió en el grup ON: *Fasn* ( $P<0.05$ ), *Scd1* ( $P<0.001$ ), *Acc1* ( $P<0.001$ ) i *Acc2* ( $P<0.001$ ). L'únic gen que va augmentar era *Fabp* ( $P<0.01$ ). Per contra, no es van observar canvis d'expressió en els gens lipolítics del grup ON de 3 setmanes de vida (Figura 30).

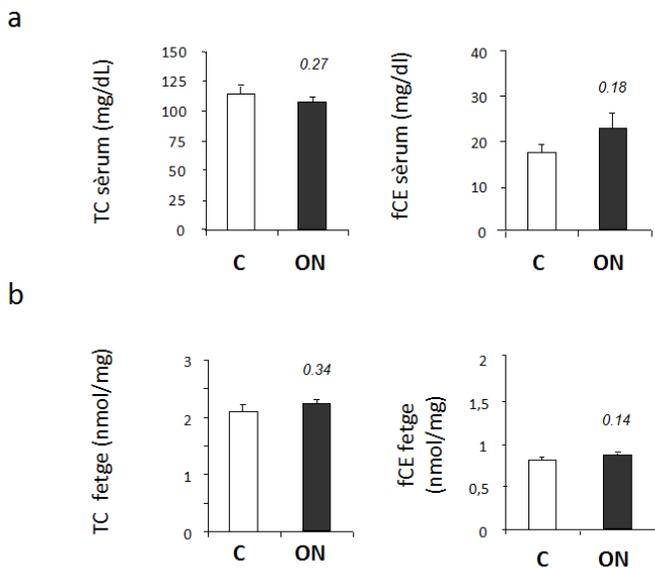
A les 4 setmanes, l'expressió gènica es va normalitzar i únicament *Scd1* i *Fabp* augmentaven en el cas de gens lipogènics ( $P<0.05$ ); i *Cpt1b* va disminuir en el cas dels gens lipolítics ( $P<0.05$ ) (Figura 30).



**Figura 30. Anàlisi de factors de regulació i enzims de la síntesi i oxidació de lípids en fetge d'animals de 2, 3 i 4 setmanes de vida.** Expressió de gens que participen en la síntesi d'àcids grassos (lipogènesi) i en l'oxidació d'àcids grassos (lipòlisi) Valors d'expressió normalitzats per Actina b. Animals dejunats 4 h (2 i 3 setmanes) o 12h (4 setmanes) . n ≥ 6 animals per grup. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM. La línia discontinua representa el l'expressió del grup C. Les barres negres representen l'expressió del grup ON. *t Student vs C*, en cursiva p-valor, \* P ≤ 0.05; \*\* P ≤ 0.01; \*\*\* P ≤ 0.001.

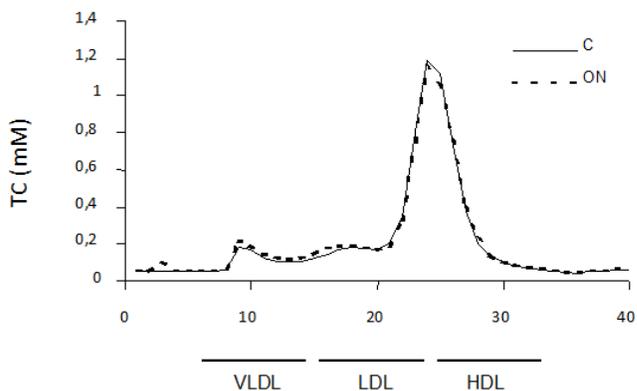
Donat que les lipoproteïnes també són responsables del transport d'èsters de colesterol i colesterol es van mesurar els nivells de colesterol en sèrum i fetge. En ambdós casos, el colesterol total, així com el lliure eren similars entre els grups ON i C (Figura 31 i b).

| 2. Programació postnatal del fenotip ON



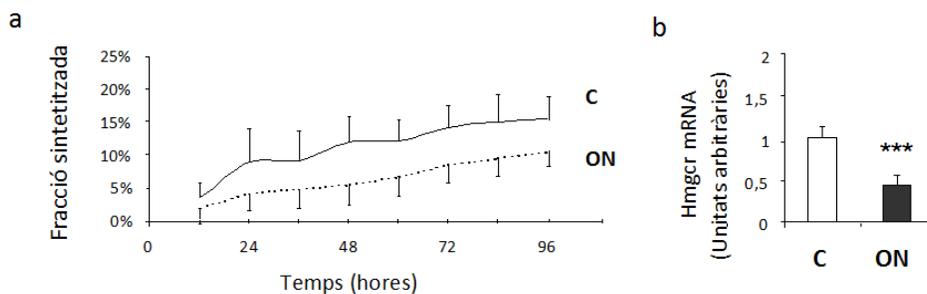
**Figura 31. Colesterol en sèrum i fetge en animals de 4 setmanes de vida.** a) Colesterol total (TC) i colesterol HDL (HDL-CE) en sèrum. b) Colesterol total (TC) i colesterol lliure (fCE) en fetge. Animals dejunats 12h.  $n \geq 8$  animals per grup. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. *t* Student vs C, en cursiva p-valor, \*  $P \leq 0.05$ .

En el perfil lipoproteic fet mitjançant cromatografia líquida (FPLC) tampoc es van observar diferències en els nivells de colesterol de les lipoproteïnes (Figura 32).



**Figura 32. Perfil de colesterol lipoproteïnes en animals de 4 setmanes de vida.** Cromatografia líquida de gel filtració (FPLC, *fast protein liquid chromatography*) realitzada en mostres de sèrum. La línia continua correspon al grup C, mentre que la línia discontinua correspon al grup ON. En l'eix de les abscisses es representen les diferents fraccions d'elució. Animals dejunats 12 h.  $n \geq 20$  animals per grup.

Malgrat no es van detectar canvis en els nivells de colesterol, es va observar una disminució en la seva síntesi en el grup ON a les 4 setmanes de vida, tan en els estudis fets mitjançant espectrometria de masses (MIDA) a partir de les gotes de sang extretes cada 12h en animals tractats amb  $^{13}\text{C}$ -Acetat (Figura 33a) com en l'expressió gènica de *Hmgcr*, principal gen en la via de síntesi de colesterol ( $P < 0.001$ ) (Figura 33).



**Figura 33. Síntesi *de novo* de colesterol en animals de 4 setmanes de vida.** a) La mesura de la síntesi *de novo* de colesterol es du a terme a partir de la incorporació de  $^{13}\text{C}$  a colesterol en animals tractats amb 10 mg  $^{13}\text{C}$ -Acetat /gr d'aigua durant 96h. La línia contínua correspon al grup C, mentre que la línia discontinua correspon al grup ON. Càlculs mitjançant anàlisi MIDA (*Mass Isotopomer Distribution Analysis*) en mostres de sang extretes a les 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 i 96 h. b) Expressió gènica de *Hmgcr* en fetge. Animals dejunats 12 h.  $n \geq 6$  animals per grup. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. *t Student vs C*, \*  $P \leq 0.001$ .

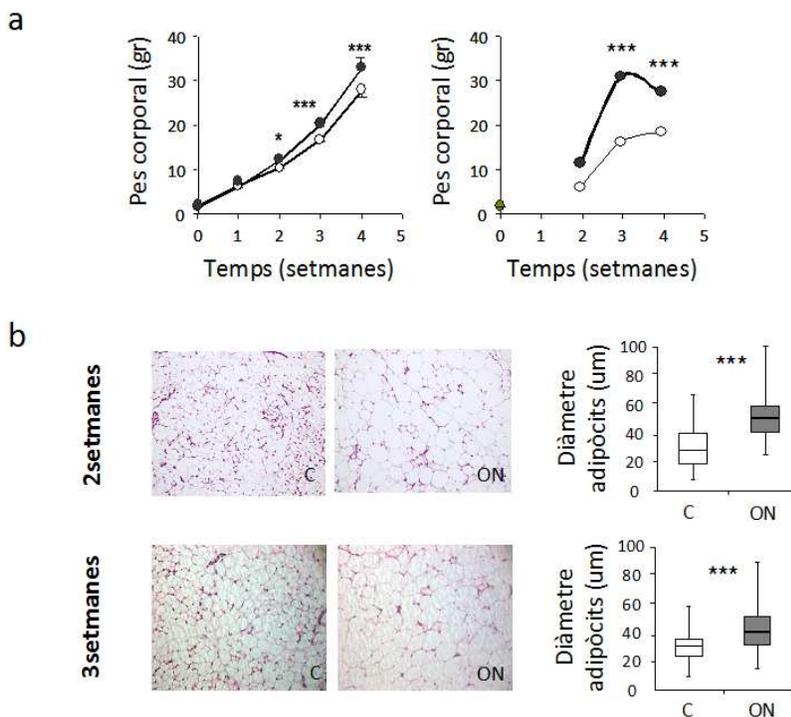
## ESTUDI HISTOLÒGIC I FUNCIONAL DEL TEIXIT ADIPÓS

En els teixits extrets durant el sacrifici dels animals a les 2 i 3 setmanes de vida es va demostrar que l'augment de teixit adipós es deu principalment a un augment de la mida dels adipòcits, que ja era aparent a les primeres setmanes de vida (Figura 34a). Aquest fet es va confirmar amb la distribució de la freqüència relativa del diàmetre dels adipòcits, així com en els càlculs derivats (Figura 34b). Igual que en els animals adults, l'augment de la mida dels adipòcits no suposa un canvi en la cel·lularitat del teixit (Figura 34b).

A continuació, no es van observar canvis en l'expressió gènica dels principals factors de transcripció que participen en la diferenciació dels adipòcits (PPAR $\gamma$ , CEBP $\alpha$  i AP2) a les 2, 3 i 4 setmanes de vida. Per tant, no hi ha diferències entre l'adipogènesi d'ambdós grups (Figura 35).

Per contra, si que hi ha diferències en l'expressió de gens de síntesi i metabolització de lípids. Pel que fa als gens lipogènics, a les 2 setmanes de vida es va observar un augment de *Fasn* ( $P < 0.05$ ) en animals ON, que es mantenia a les 3 setmanes de vida, on també va augmentar l'expressió de *Rxra*, *Fasn*, *Scd1* i *Acc1* ( $P < 0.05$ ). A les 4 setmanes, l'expressió de tots els gens era similar entre ambdós grups i únicament *Srebf1* augmentava en animals ON ( $P < 0.05$ ) (Figura 35).

## | 2. Programació postnatal del fenotip ON

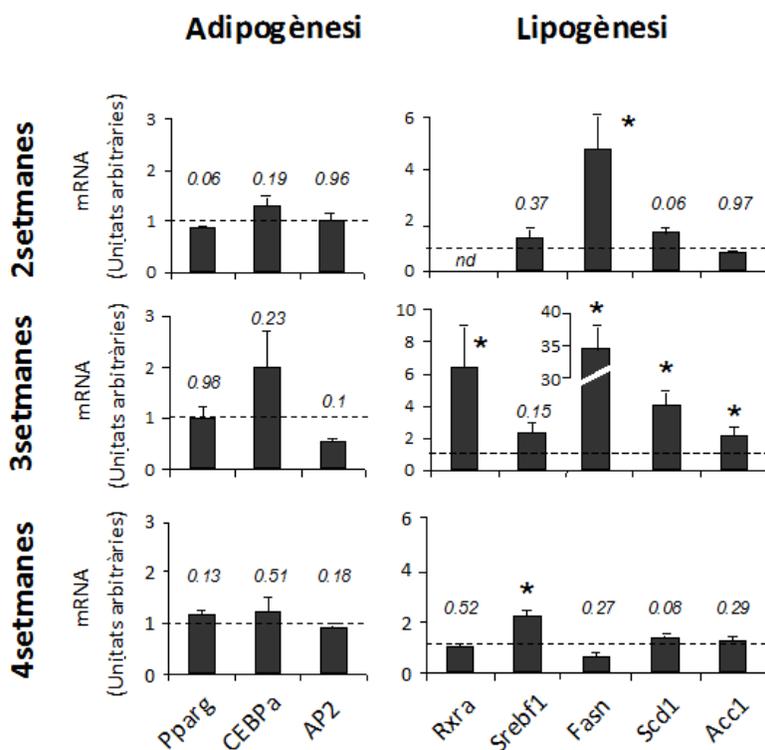


**Figura 34. Pes corporal i mida dels adipòcits durant les primeres setmanes de vida.** *a)* Pes corporal i pes del teixit adipós durant les primeres setmanes de vida. Les rodones blanques representen el grup C, mentre que les rodones negres al grup ON. Animals alimentats.  $n \geq 10$ . *b)* Adipòcits d'animals de 2 i 3 setmanes de vida tenyits amb hematoxilina-eosina. Seccions de 5  $\mu\text{m}$ . Imatge 20x. *b)* Diàmetre dels adipòcits. L'error negatiu representa el mínim, l'error positiu el màxim. La part inferior de la caixa correspon al primer quartil, mentre que la part superior al tercer quartil. La mediana és la línia que divideix la caixa. Resultats expressats com a mitjana  $\pm$  SEM. Càlculs fets a partir dels adipòcits continguts en la diagonal més llarga de cada secció en 8-10 seccions de diferents animals. Utilització del programa d'anàlisi d'imatges *Image J* (<https://rsb.info.nih.gov/ij/>). Animals dejunats 12h.  $n \geq 8-10$  animals per grup. *t* Student vs C, \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

Com es va comentar prèviament (capítol 1 de Resultats, Apartat 1.2.4), el teixit adipós és responsable de l'alliberació d'adipoquines, que realitzen múltiples funcions en l'organisme, moltes d'elles relacionades amb l'augment de pes i la resistència a la insulina (trets característics dels animals ON).

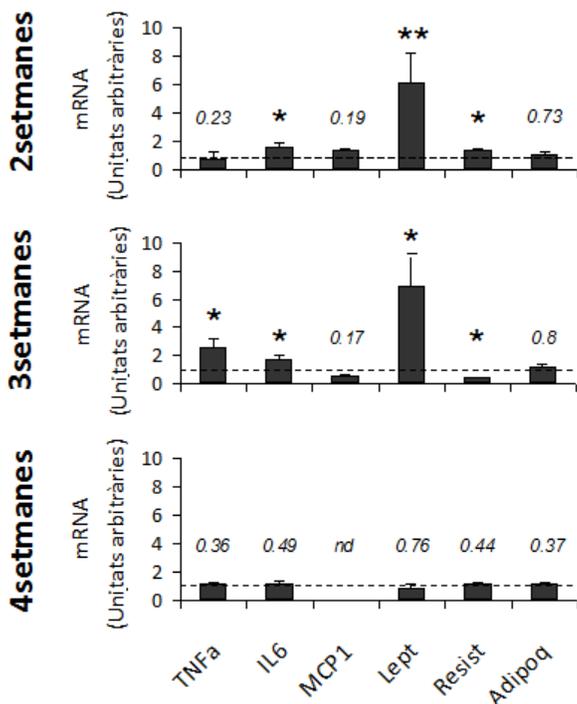
L'estudi de l'activitat transcripcional de les principals adipoquines secretades pel teixit adipós mostrava un augment de IL-6 i resistina ( $P < 0.05$ ), i leptina ( $P < 0.01$ ) en animals ON de 2 setmanes de vida. Els nivells de IL-6 i leptina seguien elevats a les 3 setmanes de vida en animals del mateix grup ( $P < 0.01$ ) juntament amb MCP1 ( $P < 0.05$ ), mentre que els valors de resistina disminuïen en comparació al grup C ( $P < 0.05$ ). A les 4 setmanes de vida no es van

observar diferències en l'expressió de les principals adipocines entre els grups ON i C (Figura 36).

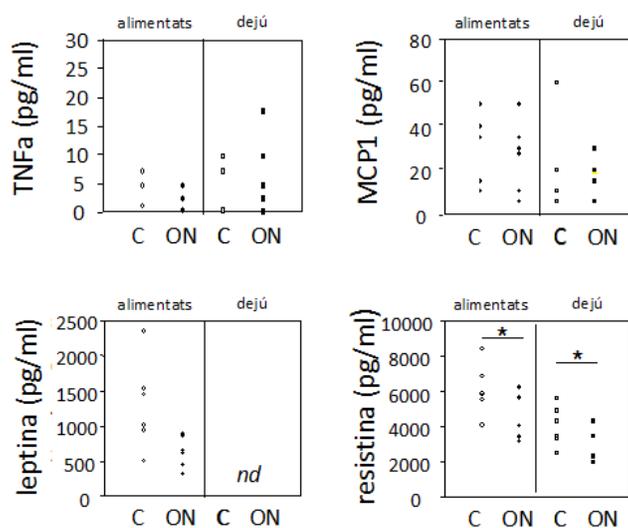


**Figura 35. Anàlisi de factors de regulació de l'adipogènesi i de la síntesi de lípids al teixit adipós en animals de 2, 3 i 4 setmanes de vida.** *Pparg*, *CEBPa* i *Apr* són de factors de transcripció que estimulen l'adipogènesi. Entre els gens que participen regulació i en la síntesi d'àcids grassos trobem *Rxra*, *Srebf1*, *Fasn*, *Scd1* i *Acc1*. Valors d'expressió normalitzats per Actina b. Animals dejunats 4 h (2 i 3 setmanes de vida) i 12 h (4 setmanes de vida).  $n \geq 6$  animals per grup. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. La línia discontinua representa el l'expressió del grup C. Les barres negres representen l'expressió del grup ON. *t Student* vs C, en cursiva p-valor. \* $P \leq 0.05$ .

En segon lloc, es van mesurar els nivells d'adipocines en sèrum tant en condicions d'alimentació com de dejú. Per qüestions tècniques únicament es va caracteritzar l'activitat secretora del teixit adipós en animals de 3 setmanes de vida. Els resultats en sèrum solament reproduïen la disminució de resistina que es va observar en teixit adipós d'animals ON en dejú de 3 setmanes de vida. Malauradament, la gran variabilitat en els resultats, així com valors per sota dels intervals de detecció van dificultar la interpretació dels mateixos (Figura 36).



**Figura 36. Expressió d'adipoquines al teixit adipós en animals de 2, 3 i 4 setmanes de vida.** Valors d'expressió normalitzats per Actina b. Animals dejunats 4 h (2 i 3 setmanes de vida) i 12 h (4 setmanes de vida).  $n \geq 6$  animals per grup. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM. La línia discontinua representa l'expressió del grup C. Les barres negres representen l'expressió del grup ON. *t Student vs C*, en cursiva p-valor, \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ .



**Figura 37. Contingut d'adipoquines en sèrum.** Cada punt correspon a un animal. Les rodones representen animals alimentats, mentre que els quadrats corresponen a animals en dejú (12 h).  $n \geq 4-6$  animals per grup. *t Student vs C*, en cursiva p-valor, \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ .





## 2.3 DISCUSSIÓ

Un dels primers efectes de la sobrenutrició neonatal, descrit en el capítol 1, és l'augment de pes i el creixement accelerat que té lloc en les primeres setmanes de vida. Com s'indica anteriorment, aquest efecte es troba altament reportat en la bibliografia (Bulfin LJ, 2011; Plagemann A, 2006; Spencer SJ, 2009; Stefanidis A, 2012).

Diversos autors descriuen un augment de la glucèmia en dejú durant el deslletament d'animals sobrenutrits (Boullu-Ciocca, 2005; Rodrigues AL, 2011). En el model animal ON, aquesta alteració ja s'observa a les 2 setmanes de vida. Durant les següents setmanes, l'augment dels nivells de glucosa és compensa progressivament amb un augment de la secreció d'insulina, de manera que a les 4 setmanes de vida, els animals ON en dejú aconsegueixen normalitzar la seva glucèmia respecte els animals C, a expenses de la hiperinsulinèmia. De fet, l'efecte positiu de la hipersecreció per part de la cèl·lula  $\beta$  dels animals ON sobre el control de la glucèmia, s'observa en la millora en la tolerància en resposta a un bolus de glucosa (ipGTT, Figura 24). Aquesta desregulació de la cèl·lula  $\beta$  suposa el primer estadi en el desenvolupament de Diabetis tipus 2, i és potenciada pels primers defectes en la sensibilitat a la insulina (Inzucchi SE, 2012; Kirkman MS, 2006), que en animals ON s'observa ja a les 4 setmanes de vida (ipITT, Figura 25; test de sensibilitat a la insulina, Figura 26).

L'estudi de la sensibilitat perifèrica a la insulina confirma que existeix resistència hepàtica i del teixit adipós a les 4 setmanes de vida. Els animals ON ja presenten el patró de resistència que s'observa en animals adults (descriu en el capítol 1), on la falta de resposta d'Akt es tradueix, a la vegada, en una falta de resposta de Gsk3. Per contra, la sensibilitat al múscul en els animals ON és inclús millor que en animals C. Aquest efecte podria ser una compensació del múscul a la resistència que es desenvolupa als altres teixits. De nou, s'observa una hiperactivació basal de la via, que reproduceix alhora els resultats observats en animals adults.

Per últim, els últims experiments realitzats al laboratori semblen indicar que a les 2 setmanes de vida els animals ON ja són resistents. Es tracta però de dades preliminars que falta confirmar. En resum, sembla que la resistència a la insulina que s'observa en fetge i teixit adipós d'animals ON adults es desenvolupa en les primeres setmanes de vida, i contribueix a altres complicacions associades a la Síndrome Metabòlica, com per exemple, la hiperinsulinèmia.

La resistència a la insulina és una de les causes subjacents de la Síndrome Metabòlica (Smith DO, 2004; Setsi G, 2006; Lann D, 2007). Diversos autors postulen, però, que la resistència a la insulina és causa i alhora conseqüència en el fenotip de la Síndrome Metabòlica (Hall JE, 1995; Shanik MH, 2008; Kashyap S, 2003).

Una possible causa que té com a conseqüència la resistència a la insulina és l'alteració en el metabolisme lipídic (Johnson AM, 2013; Storlien LH, 1991; Koyama K, 1997; Schinner S, 2005; Roden M, 1996). De fet, a les 4 setmanes de vida s'observa una acumulació hepàtica de lípids, fet pel qual la majoria d'estudis sobre el metabolisme lipídic en animals ON joves es realitzen a les 4 setmanes de vida. Per una banda, els nivells de triglicèrids es troben

augmentats en sèrum i fetge, així com els àcids grassos en sèrum. Igualment el contingut de lipoproteïnes VLDL augmenta. Per contra, segons l'assaig d'incorporació de  $^{13}\text{C}$ -Acetat a la síntesi d'àcids grassos, sembla que la lipogènesi *de novo* es troba disminuïda. A favor d'aquesta disminució de la lipogènesi, l'expressió hepàtica dels principals gens implicats en la síntesi i oxidació de lípids disminueix durant les primeres setmanes de vida.

Una possible explicació seria la disminució de la lipòlisi a les 2 setmanes de vida com a resposta efectiva per evitar un augment de triglicèrids en sèrum i a continuació una disminució en la lipogènesi hepàtica a les 3 setmanes com a mesura protectora per intentar evitar l'acumulació de triglicèrids hepàtics. La resistència a la insulina faria que a les 4 setmanes de vida aquestes mesures no fossin suficients i tingués lloc l'acumulació de triglicèrids tant en sèrum com fetge. Juntament amb la disminució de la lipogènesi *de novo*, l'augment de l'expressió de Fabp, un transportador d'àcids grassos, explicaria la hipertrigliceridèmia que s'observa per un defecte en la recirculació de lípids.

En el metabolisme del colesterol, a les 4 setmanes de vida els animals ON tenen nivells similars als animals C. Curiosament, tant la síntesi de colesterol a partir de  $^{13}\text{C}$ -Acetat, com l'expressió gènica de *Hmgcr* disminueixen en animals ON de 4 setmanes de vida. Per contra, com es descriu en el primer capítol, en animals ON adults s'observa hipercolesterolèmia. Per tant, en algun moment es produeix una desregulació del metabolisme del colesterol. Potser es tracta d'una mesura preventiva per evitar l'augment de colesterol davant l'augment de la disponibilitat de substrats, un defecte en el transport revers de colesterol o la síntesi, en l'absorció d'àcids biliars o en l'excreció. Amb l'edat, aquesta mesura no seria suficient i, finalment els animals ON desenvoluparien hipercolesterolèmia. Aquesta hipòtesi requereix experiments addicionals per ser contrastada.

L'acumulació de lípids que s'observa en animals ON de 4 setmanes de vida fa especialment interessant l'estudi del teixit adipós en aquest període primerenc, ja que la seva funció principal és l'emmagatzematge de lípids. De fet, sembla que els canvis de pes corporal que s'observen ja a les 2 setmanes de vida es deuen principalment a un augment de la massa del teixit adipós. Aquest augment de teixit adipós és conseqüència d'una hipertròfia del teixit i no una hiperplàsia. Així doncs, a les 2 setmanes de vida, els adipòcits dels animals ON ja tenen major capacitat per emmagatzemar triglicèrids. Aquesta alteració va acompanyada d'un augment de gens lipogènics, que esdevé important a les 3 setmanes de vida. Per tant, durant les primeres setmanes de vida, al teixit adipós dels animals ON es produeix un augment de l'emmagatzematge de triglicèrids degut a un augment de la lipogènesi.

L'augment de l'activitat lipogènica dels adipòcits també va acompanyada d'un augment d'algunes adipoquines, en especial la leptina. La producció i secreció d'adipoquines pot afectar el metabolisme general, participant en processos com el control de la ingesta, la sensibilitat a la insulina o la inflamació (Stofkova A, 2009; Ouchi N, 2011; Ozarda Y, 2012). L'expressió gènica d'adipoquines no reproduïx la mesura dels nivells sèrics, probablement perquè en els experiments realitzats en sèrum, els valors obtinguts es troben al llindar de detecció de la tècnica. Així doncs, és difícil treure'n conclusions i no es pot descartar la inflamació com a possible causa de la resistència a la insulina.

En animals ON de 4 setmanes no existeixen diferències en l'expressió gènica de les principals adipoquines. A més, en animals ON adults, tampoc s'observen diferències, i per aquest motiu s'havia descartat la relació entre la inflamació i la resistència a la insulina en animals adults.

En aquest punt, és necessari fer un recordatori sobre el model ON: el deslletament es produeix a les 3 setmanes de vida. En el moment del deslletament, s'ajusta el nombre d'animals per gàbia, i els animals ON passen de 4 a 8. Per tant, a les 3 setmanes de vida, hi ha un canvi de dieta (de llet a pinsó) i una normalització del nombre de cries/gàbia. És important veure que alguns aspectes com la lipogènesi o la lipòlisi hepàtica, i l'adipogènesi, lipogènesi i secreció d'adipoquines al teixit adipós es troben alterats a les 3 setmanes de vida i es normalitzen a les 4 setmanes, just després del deslletament. Per contra, el metabolisme lipídic es troba alterat a les 4 setmanes de vida tot i aquestes alteracions persisteixen en l'edat adulta. Sembla doncs, que existeix una programació del metabolisme, de manera que canvis durant les primeres setmanes de vida, i concretament durant l'etapa d'alletament, tenen conseqüències en l'edat adulta. Aquest efecte es força reportat en la bibliografia (Lucas A, 1991; Gluckman P, 2006; Wang X, 2013; Neu J, 2007; Martin-Gronert, MS, 2012, Martin-Gronert MS, 2013; de Moura EG, 2009; Lima NS, 2011; Plagemann A, 2012; McMillen C, 2005; Habbout A, 2012;) i és el principal tema en la discussió general.

En resum, la sobrenutrició postnatal durant les primeres setmanes de vida indueix canvis en el metabolisme que es mantenen en l'edat adulta. Algunes d'aquestes alteracions, tals com

- intolerància a la glucosa,
- hiperinsulinèmia
- resistència a la insulina
- hipertrigliceridèmia

on 1) la hiperinsulinèmia seria un primer pas en el control de la glucosa, però esdevindria insuficient, en part per l'aparició de resistència, i 2) la disminució de la lipogènesi *de novo* resultaria insuficient, de nou, degut a la resistència, i provocaria l'acumulació de triglicèrids hepàtics.

Sembla doncs que almenys al fetsge l'aparició de resistència precedeix la hipertrigliceridèmia. En favor d'aquesta hipòtesi, nous experiments preliminars semblen indicar la resistència com un dels factors importants orquestrant l'aparició de la resta d'alteracions.

Tot i que algunes alteracions precedirien l'aparició d'altres, no hi hauria un únic desencadenant ni un sol fil conductor, sinó que es tracta d'una xarxa estretament interconnectada on molts factors són alhora causa i conseqüència. Molts dels mecanismes relacionats amb aquestes alteracions en edats primerenques quedarien programats metabòlicament afectant el metabolisme durant l'edat adulta.



### 3. TRANSMISSIÓ INTERGENERACIONAL DEL FENOTIP ON



### 3.1 INTRODUCCIÓ

Evidències epidemiològiques suggereixen que alteracions nutricionals durant les primeres etapes de la vida poden influir en el risc de desenvolupar diabetis en subseqüents generacions (Gallou-Kabani C, 2005). S'ha demostrat que un augment de la disponibilitat de nutrients durant el període de creixement prepuberal dels avis incrementa el risc de malalties cardiovasculars i morts relacionades amb diabetis en els seus néts (Bygren LO, 2001; Kaati G, 2007; Pembrey ME, 2006; Kaati G 2002).

En aquest capítol s'estudia una possible herència transgeneracional del fenotip específica del llinatge masculí. Encara que els mecanismes no estan clars, sembla que la contribució genètica del cromosoma Y no es pot descartar completament, i els mecanismes epigenètics podrien explicar aquests efectes transgeneracionals.

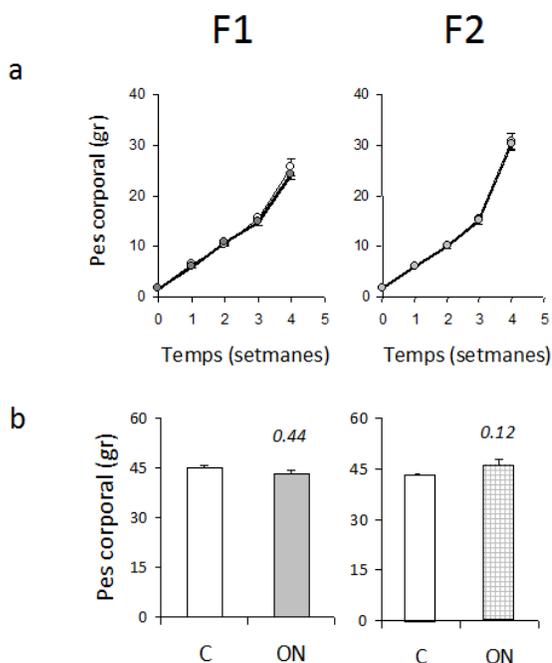


### | 3. Transmissió intergeneracional del fenotip ON

## 3.2 RESULTATS

### 3.2.1 NUTRICIÓ I CREIXEMENT POSTNATAL

Per investigar l'herència del fenotip ON a subseqüents generacions, és important especificar i tenir clar el protocol del model animal. En la generació parental F0, estudiada en els capítols 1 i 2 de Resultats, la sobrenutrició s'indueix disminuint el nombre de cries/mare després del naixement, ajustant la ventrada a 8 cries/mare en el grup control (C-F0) i 4 cries/mare en el grup de sobrenutrició (ON-F0) (Apartat 1.1, Material i Mètodes).



**Figura 38. Corba de creixement i pes corporal en animals de les generacions F1 i F2.** a) Corba de creixement durant les primeres setmanes de vida. Animals alimentats. F1  $n \geq 28$  i F2  $n \geq 21$ . b) pes corporal en animals adults de 4 mesos de vida. F1  $n \geq 20$  i F2  $n \geq 20$ . *t Student vs C: en cursiva p-valor*

Als dos mesos de vida, els mascles dels grups C-F0 i ON-F0 es creuen amb femelles control verges, per donar lloc a la F1. Al naixement, el nombre de cries/mare s'ajusta a 8, tant en el grup C-F1 com ON-F1, de manera que les cries d'aquest últim grup, ON-F1, no es sotmeten a sobrenutrició respecte el grup C-F1. Repetint el mateix protocol, però utilitzant mascles dels grups C-F1 i ON-F1 es genera la F2. De nou, cal recordar que en tots els casos la dieta de la mare és normal i l'alletament lliure.

### | 3. Transmissió intergeneracional del fenotip ON

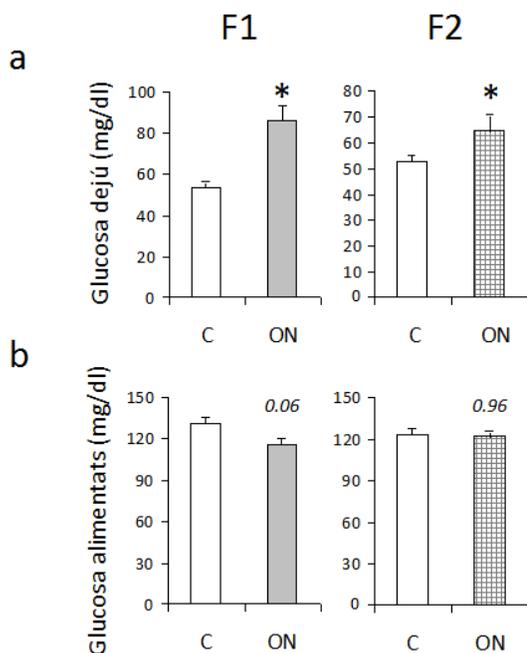
Per tant, en el model animal ON la única generació exposada a sobrenutrició és la generació parental F0.

En l'avaluació del fenotip en les generacions F1 i F2, els animals del grup ON d'ambdues generacions van mostrar un pes similar al corresponent grup C durant les primeres setmanes de vida (Figura 38a). Igualment, no es van observar diferències en la ingesta entre grups, i el creixement postnatal va ser normal en els animals ON-F1 i ON-F2 en comparació als seus respectius controls (Figura 38b i c).

En animals adults de 4 mesos de vida, el pes corporal dels animals ON-F1 i ON-F2 seguia sent similar al grup control (Figura 38d)

### 3.2.2 GLUCÈMIA I TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA

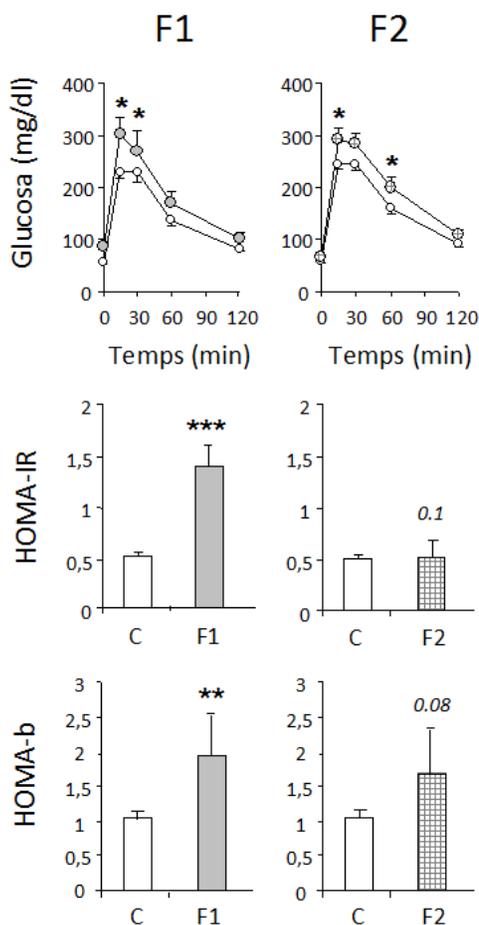
A continuació, es va estudiar l'herència de alteracions metabòliques observades en la generació parental ON-F0. La glucèmia en dejú era més alta en animals de 4 mesos de vida dels grups ON-F1 ni ON-F2 respecte els controls ( $P < 0.05$ ) (Figura 39a). No es van observar diferències en els nivells de glucosa en animals alimentats d'ambdós grups (Figura 39b).



**Figura 39. Nivells de glucosa en sèrum en animals adults de les generacions F1 i F2. a)** Glucosa en dejú. Animals dejunats 12h. F1 n≥ 11 i F2 n≥ 13 . **b)** Glucosa en animals alimentats. F1 n≥ 26 i F2 n≥ 21 t Student vs C: en cursiva p-valor \* P ≤ 0.05.

### 3.2.3 SENSIBILITAT A LA INSULINA

A partir de les mostres de sèrum extretes durant el ipGTT, a temps 0 i 30 min es van mesurar els nivells d'insulina i es va calcular l'índex HOMA-IR per estimar si la resistència a la insulina observada en el grup ON-F0 persisteix en les generacions F1 i F2. Efectivament, en els animals ON-F1 es va observar resistència a la insulina ( $P < 0.05$ ) i una tendència, encara que no significativa, en els animals ON-F2 (Figura 40b).



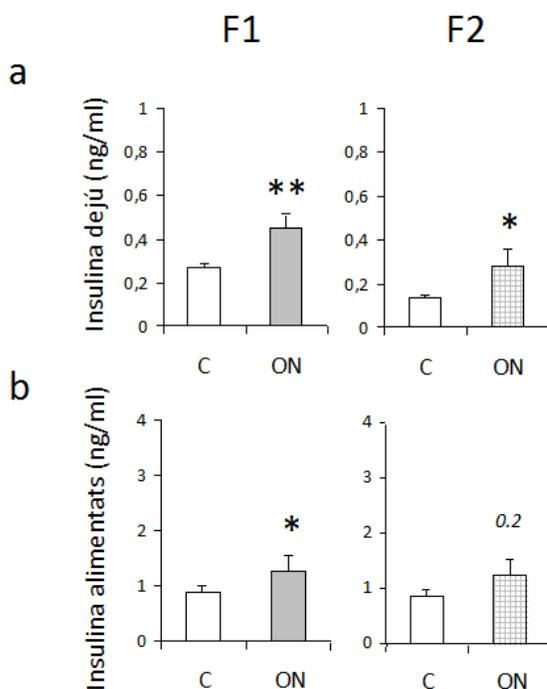
**Figura 40. Tolerància a la glucosa en animals de adults de les generacions F1 i F2 4 mesos d'edat.** ipGTT (2 gr glucosa /kg pes corporal). Mesura de la sensibilitat a la insulina durant ipGTT segons l'índex  $HOMA-IR = [Glucosa (mg/dl)] / 405$ . Mesura de la secreció d'insulina durant ipGTT segons l'índex  $HOMA-b = \Delta Insulina_{30-0min} / \Delta Glucosa_{30-0min}$ . Animals dejunats 12 h. F1  $n \geq 14$  i F2  $n \geq 14$  animals per grup. Resultats expressats com mitjana  $\pm$  SEM. *t Student* vs C: \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

### | 3. Transmissió intergeneracional del fenotip ON

Amb l'índex HOMA-b, també es va observar com la major secreció de insulina en resposta als nivells de glucosa del grup ON-F0 persistia en la generació F1 ( $P < 0.05$ ) i de nou, una tendència no significativa en la generació F2 (Figura 40c).

Per tant, en el grup ON-F1 es va observar resistència a la insulina i hipersecreció de la cèl·lula  $\beta$ , i en el grup ON-F2 es va observar resistència a la insulina i una alteració en la secreció de la cèl·lula  $\beta$  en un ipGTT.

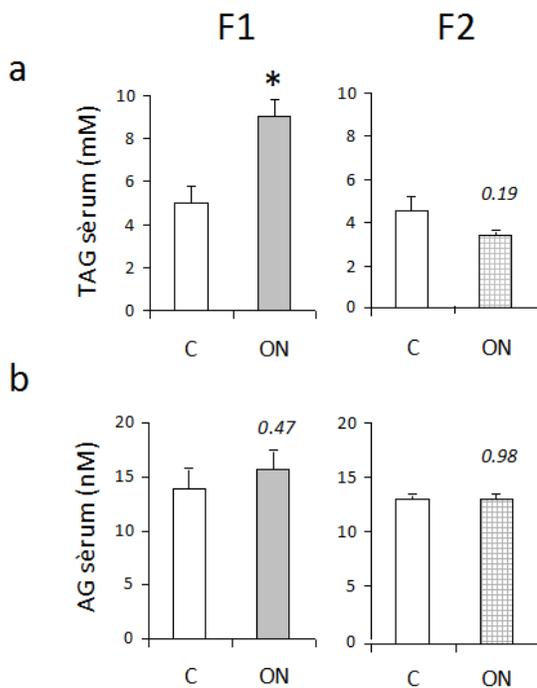
Així mateix es va observar en animals ON-F1 un augment significatiu de la insulinèmia en condicions tant de dejú ( $P < 0.01$ ) com d'alimentació ( $P < 0.05$ ). En el cas de la generació F2, els animals ON-F2 van mostrar un augment dels seus nivells d'insulina en ambdós casos (dejú i alimentació) però en cap cas van ser significatius (Figura 41).



**Figura 41. Nivells d'insulina en sèrum en animals de adults de les generacions F1 i F2. a) Insulina en animals dejunats 12h., b) Insulina en animals alimentats. F1  $n \geq 15$  i F2  $n \geq 12$ . Resultats expressats com mitjana  $\pm$  SEM. *t Student vs C*, en cursiva p-valor, \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ .**

### 3.2.4 ESTUDI DEL METABOLISME LIPÍDIC

La mesura de triglicèrids en sèrum va permetre observar que la hipertrigliceridèmia dels animals ON-F0 es mantenia, encara que no tan severa, en la següent generació ON-F1, ( $P < 0.05$ ). D'altra banda, els animals ON-F2 presentaven nivells de triglicèrids similars al corresponent grup, C-F2 (Figura 42a). Els nivells d'àcids grassos eren similars entre ambdós grups tan en la generació F1 com F2 (Figura 42b).



**Figura 42. Contingut de triglicèrids (TAG) i àcids grassos (AG) en animals adults de les generacions F1 i F2. a) Contingut de triglicèrids en sèrum. b) Contingut d'àcids grassos. Animals dejunats 12 h. F1  $n \geq 8$  i F2  $n \geq 11$ . Resultats expressats com mitjana  $\pm$  SEM. *t Student vs C*, en cursiva p-valor, \*  $P \leq 0.05$ .**

### | 3. Transmissió intergeneracional del fenotip ON

### 3.3 DISCUSSIÓ

Els animals ON adults de les generacions F1 i F2 tenen un alteració en el metabolisme de la glucosa, ja que presenten hiperglucèmia en dejú i intolerància a la glucosa. Aquest fet està en acord a la bibliografia existent, que suggereix que la sobrenutrició en l'etapa postnatal pot tenir conseqüències en subseqüents generacions (Kaati G, 2002). Donat que l'estudi del model ON es realitza únicament en mascles, els resultats obtinguts demostren que la inducció postnatal del fenotip diabètic s'hereta a partir del llinatge masculí.

Es coneix molt bé la influència materna sobre el metabolisme de la seva descendència (efecte matern) (Gallou-Kabani C, 2005; Aerts L, 2006), però la literatura que descriu l'efecte patern és escassa i sol existeixen alguns exemples en models animals (Natt D, 2009; Sharma A, 2009; Jimenez-Chillaron JC, 2009) i en humans (Kaati G, 2002, Veenendaal MV 2013; Chen TH, 2006). Els resultats d'aquests estudis, juntament amb les observacions fetes en animals ON, són molt rellevants clínicament, ja que suggereixen que la història paterna pot tenir una influència més profunda del que es pensava sobre el metabolisme de la descendència.

Mecanísticament, l'herència d'un fenotip induït per factors ambientals es deu a modificacions epigenètiques de les cèl·lules de la línia germinal (Gluckman PD, 2007 Youngson NA, 2008). En aquest aspecte, s'ha demostrat que la nutrició i altres factors ambientals poden modificar l'epigenoma durant les primeres etapes de la vida, incloent tant la metilació del DNA com la modificació d'histones, tant en cèl·lules somàtiques com de la línia germinal (Plagemann A, 2009, Gluckman PD, 2007; Jirtle RL, 2007; Anway MD, 2005; Park JH, 2008).

Fisiològicament, en el capítol 1 es descriu que la intolerància a la glucosa en animals ON-F0 es deu, principalment a resistència a la insulina, ja que la cèl·lula  $\beta$  encara és capaç d'augmentar la secreció per compensar aquest defecte. Els índex HOMA-IR i HOMA-b en les generacions F1 i F2 indiquen que, de manera similar, l'alteració en la tolerància a la glucosa que s'observa en un ipGTT en animals ON-F1 i ON-F2 es pot atribuir a la presència de resistència perifèrica a la insulina. En acord, la hiperglucèmia en dejú en animals ON-F1 i ON-F2 (sumada a un context d'hiperinsulinèmia, en el cas de la ON-F1) suggereix una possible alteració en la gluconeogènesi hepàtica, probablement deguda a la resistència a la insulina al fetge.

En resum, tot i una tendència fisiològica al llarg de les tres generacions, l'herència del fenotip és heterogènia i no inclou de la mateixa manera totes les alteracions descrites en animals ON-F0. En primer lloc, els animals ON-F1 i ON-F2 no desenvolupen obesitat i el pes corporal es manté similar als controls. Tot i un pes similar als seus respectius controls, els animals ON-F1 desenvolupen,

- intolerància a la glucosa
- hiperglucèmia en dejú
- resistència a la insulina
- hipertrigliceridèmia



### | 3. Transmissió intergeneracional del fenotip ON

Per altra banda, els animals ON-F2 tenen un fenotip més suau que els animals ON-F1, que es caracteritza per la presència de

- intolerància a la glucosa
- hiperglucèmia en dejú

Es coneix que els efectes transgeneracionals són molt complexos i heterogenis. El fenotip d'un individu és el resultat de la interacció entre genotip, epigenoma i l'ambient ancestral, passat i present. Sovint, en els efectes transgeneracionals és difícil aïllar l'epigenètica de la variació genètica i les mutacions. A més, la naturalesa i la intensitat del factor, la finestra espacial i temporal i el procés del desenvolupament implicats, poden influir en l'heterogeneïtat de l'herència epigenètica (Gallou-Kabani C, 2007). Mutacions o canvis en l'ADN poden induir marques epigenètiques heretables (Jablonka E, 2009). A més, segons on tinguin lloc les mutacions, és possible influenciar l'estructura epigenètica de gens específics o del genoma sencer (en particular, si els gens que codifiquen per la maquinària epigenètica es troben afectats (Jablonka E, 2009; Mohn F, 2009). D'altra banda, les modificacions epigenètiques tenen una capacitat potencial d'augmentar la probabilitat de mutació, transposició o recombinació de la seqüència d'ADN (Jablonka E, 1995; Jablonka E, 2009). Aquesta relació bidireccional entre l'epigenètica i la genètica suposa una interferència alhora de determinar els mecanismes i les marques epigenètiques al llarg de les generacions, i esdevé un factor crític alhora d'interpretar la variació fenotípica (Curley JP, 2012).

El tipus d'heterogeneïtat que s'observa en el model ON s'ha descrit en d'altres models animals on la herència de fenotips es produeix a través de la línia paterna. Per exemple, una dieta rica en greixos durant la gestació induïx augment de pes, longitud i resistència a la insulina en la descendència, F1 (Dunn GA, 2009). La descendència dels mascles F1 (F2) també desenvolupa resistència a la insulina i augment de la longitud, però no de pes corporal. Curiosament, els descendents dels mascles F2 (F3), encara són més grans que els ratolins control, segons la seva longitud, però són normoresistents i, encara més sorprenent, presenten una millora en la tolerància a la glucosa (Dunn GA 2011). En un altre model, la descendència de ratolins sotmesos a malnutrició per restricció calòrica (50%) durant la gestació desenvolupa en l'edat adulta obesitat i intolerància a la glucosa, caracteritzada per una alteració funcional de la cèl·lula beta (Jimenez-Chillaron JC, 2005). De nou, i com s'ha descrit al model ON, la descendència dels ratolins mascles F1 (F2) també desenvolupa intolerància a la glucosa i presenta una alteració de la funció pancreàtica (Jimenez-Chillaron JC, 2009). En canvi, aquest ratolins F2 no només no desenvolupen obesitat sinó que presenten una tendència no significativa a ser més prims que els animals controls.

Un altre aspecte remarcable, és que al model ON la desregulació metabòlica disminueix de forma considerable en la segona generació. La pèrdua de fenotip al llarg de les generacions s'ha descrit prèviament en altres models animals (Jimenez-Chillaron JC, 2009; Benyshek DC, 2006; Zambrano E, 2005).

Aquests dos aspectes són, *per se*, molt importants a l'hora de postular potencials mecanismes moleculars. Així, tant la heterogeneïtat en la transferència de fenotips com la disminució de la penetrància de fenotips clarament suggereixen un patró d'herència complexa per mecanismes no genòmics (Gluckman, Bioessays, 2007). La presència de

mutacions resultaria en la transmissió del mateix fenotip sense cap afebliment en la seva penetrància en successives generacions. Això, i donat que la transmissió dels fenotips es produeix a través de la línia paterna (tot exclouent la complexitat dels efectes materns: fisiologia de la mare durant la gestació, comportament matern, ADN mitocondrial, etc.), fa molt possible que aquests efectes transgeneracionals es produeixin a través de modificacions del epigenoma en cèl·lules de la línia germinal. Aquestes modificacions s'han de mantenir de manera estable a la descendència i contribuir, en part, al desenvolupament dels fenotips adults.

Per tant, la heterogeneïtat i la pèrdua de penetrància en l'efecte transgeneracional del fenotip ON reforcen la implicació de les modificacions epigenètiques, ja que els canvis en la seqüència de DNA es mantenen estables al llarg de les generacions (Gallou-Kabani C, 2005).



## **DISCUSSIÓ GENERAL**



El model ON desenvolupat al laboratori aporta nous coneixements sobre l'efecte de perturbacions ambientals com la nutrició, en el desenvolupament de malalties en l'edat adulta.

En primer lloc, els estudis en animals adults van permetre determinar que es tracta d'un nou model on la sobrenutrició neonatal suposa un risc elevat de desenvolupar Síndrome Metabòlica en l'edat adulta. En la caracterització del fenotip, el estudi en animals adults van permetre determinar que els animals ON desenvolupen obesitat, intolerància a la glucosa, hiperinsulinèmia, resistència a la insulina, hipertrigliceridèmia i hiperinsulinèmia. Es tracta d'alteracions en el metabolisme que són conseqüència de perturbacions que han tingut lloc en un altre moment. Aquest fet suggereix l'existència d'una programació metabòlica.

Tot i que existeixen molts estudis que confirmen una programació metabòlica durant l'etapa postnatal, que dona lloc als efectes en l'adult i la seva descendència (Martin-Gronert MS, 2013; Davidowa H, 2007; Plagemann A, 1999 Waterland, 2013; Renovato M, 2008; Habbout A, 2013), encara és desconegut gran part dels mecanismes responsables.

Així doncs, si les observacions en l'adult han estat induïdes en l'etapa primerenca, l'estudi dels animals ON durant les primeres setmanes de vida pot ajudar a entendre i aprofundir en els mecanismes que donen lloc al fenotip adult.

Els estudis en animals joves, de fins a 4 setmanes de vida, van permetre determinar per primera vegada que moltes de les alteracions observades en els adults ja estan presents en les primeres setmanes de vida. Per exemple, a les 4 setmanes de vida els animals ON ja presenten la resistència a la insulina, i probablement, aquesta resistència a la insulina és, en gran part, responsable d'altres alteracions com la hiperinsulinèmia en dejú, canvis en el metabolisme lipídic (principalment acumulació de lípids en un context de síntesi hepàtica disminuïda) i alteracions del metabolisme glucídic.

Nous experiments, que s'estan realitzant al laboratori, ajudaran a definir el desenvolupament de la resistència a la insulina durant les dues primers setmanes de vida i inclús abans, i aportaran nous coneixements sobre els mecanismes que hi donen lloc.

Per últim, l'estudi de la descendència va permetre determinar que molts dels trets observats en la generació parental ON-F0 persisteixen en la descendència, que no ha estat sobrenutrida. Aquesta herència transgeneracional del fenotip ON dona suport a la existència d'una programació metabòlica que causaria alteracions permanents no tan sols en cèl·lules somàtiques, sinó també en cèl·lules de la línia germinal. Les adaptacions somàtiques explicarien el fenotip diabètic en la generació parental F0, mentre que les modificacions en cèl·lules de la línia germinal establirien les bases de la transmissió transgeneracional.

Alternativament, pot ser possible que l'obesitat paterna *per se* (o obesitat relacionada amb el metabolisme) indueixi, indirectament, modificacions en l'esperma, i aquestes es transmetin a la generació següent, donat que existeix una estreta relació entre la obesitat i el desenvolupament de resistència a la insulina (Gupta D, 2012; Johanson AM, 2013; Watanabe Y, 2013). El sobrepès dels animals ON-F0 reforça aquesta possibilitat. A partir dels experiments realitzats en aquesta tesi, no és possible distingir entre les dues opcions

potencials, així que en aquest aspecte, seria interessant dissenyar un experiment on la sobrenutrició neonatal no donés lloc a obesitat en l'edat adulta, a fi de determinar si animals ON-F0 no obesos transmeten el fenotip metabòlic a les generacions següents.

Alguns estudis demostren les modificacions epigenètiques com a mecanismes de programació metabòlica. Per exemple, les cries de mascles alimentats amb dietes pobres en proteïnes presenten canvis de metilació en gens relacionats amb la síntesi de lípids i colesterol (Carone BR, 2010). Igualment, canvis en la dieta materna, indueixen canvis de metilació en les cries, que en última alteren l'expressió hepàtica del receptor de glucocorticoids o PPAR $\alpha$  (Lillicrop KA, 2005).

Pel que fa als canvis epigenètics existeixen molts candidats que fan referència al terme de programació durant el desenvolupament (Rees WD, 2000; Lillicrop KA, 2005; Cerda S, 1997; Weaver IC, 2004; Weaver IC, 2006; Bannister AJ, 2005). En el model ON es postula l'epigenètica com a possible responsable de la transmissió del fenotip.

Els mecanismes pels quals factors ambientals com la nutrició, donen lloc a canvis epigenètics específics, com per exemple en la metil·lació del DNA no estan clars (Nuyt AM, 2007).

En resum, el model ON suposa una nova eina, molt valuosa, en l'estudi de l'etapa neonatal en l'origen de les malalties de l'adult. Així mateix, aporta nous coneixements sobre el desenvolupament postnatal de la Síndrome Metabòlica i l'epigenètica com a possible factor mitjancer, responsable en última instància, de la transmissió a subseqüents generacions.

## **CONCLUSIONS**





Dels resultats presentats en aquesta tesi doctoral s'extrauen les següents conclusions:

1. La sobrenutrició neonatal provoca un ràpid augment de pes i un creixement accelerat durant l'etapa postnatal. Les diferències de pes es mantenen en l'adult.
2. Els animals exposats a sobrenutrició neonatal desenvolupen en l'edat adulta intolerància a la glucosa, hiperinsulinèmia, resistència a la insulina i dislipèmia.
3. La intolerància a la glucosa dels animals ON adults es deu principalment a la resistència a la insulina al fetge i al teixit adipós.
4. La dislipèmia dels animals ON adults es caracteritza per l'acumulació de triglicèrids (en sèrum, fetge i múscul), colesterol hepàtic i un augment de la producció de VLDL.
5. Moltes de les observacions realitzades en animals ON adults ja estan presents en les primeres setmanes de vida. Així, els animals ON de 4 setmanes de vida presenten intolerància a la glucosa, hiperinsulinèmia, resistència a la insulina al fetge al teixit adipós i dislipèmia.
6. Els animals ON acumulen triglicèrids durant les primeres setmanes de vida en un context on la lipogènesi *de novo* es troba disminuïda.
7. Aparentment, al fetge l'aparició de resistència a la insulina precedeix la hipertrigliceridèmia.
8. La sobrenutrició neonatal no tan sols afecta a l'adult sinó també la seva descendència (F1 i F2; fills i néts).
9. La descendència ON-F1 desenvolupa intolerància a la glucosa, hiperglucèmia en dejú, resistència a la insulina i hipertrigliceridèmia.
10. La descendència ON-F2 presenta un fenotip més suau que es caracteritza per intolerància a la glucosa i hiperglucèmia en dejú.
11. La heterogeneïtat i disminució en la penetrància del fenotip, així com l'herència a través del llinatge patern suggereixen l'epigenètica com a mecanisme responsable.

Per tant, la sobrenutrició neonatal és responsable de la Síndrome Metabòlica en l'adult, així com en la seva descendència. En la programació metabòlica del fenotip podrien contribuir, probablement, els mecanismes epigenètics.



## **BIBLIOGRAFIA**



- Abdelmalek M.F., Diehl A.M. *Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance*. Med. Clin. North Am. 2007; 91:1125–1149
- Adams L.A., Lindor K.D. *Nonalcoholic fatty liver disease*. Ann. Epidemiol. 2007; 17:863–869
- Aerts L, Van Assche FA. *Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus*. Int J Biochem Cell Biol. 2006;38(5-6):894-903
- AlSaraj F, McDermott JH, Cawood T, McAteer S, Ali M, Tormey W, Cockburn BN, Sreenan S. *Prevalence of the metabolic syndrome in patients with diabetes mellitus*. Ir J Med Sci. 2009 Sep;178(3):309-13
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. *Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility*. Science. 2005 Jun 3;308(5727):1466-9
- Alegria Ezquerro E, Castellano Vázquez JM, Alegria Barrero A. *Obesidad, síndrome metabólico y diabetes: implicaciones cardiovasculares y actuación terapéutica*. Rev Esp Cardiol 2008; 61 (7) 752-64
- Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. *Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states*. Clin Chim Acta. 2006 Jun;368(1-2):1-19. Epub 2006 Feb 9
- Barker DJ. *The developmental origins of adult disease*. J Am Coll Nutr. 2004 Dec;23(6 Suppl):588S-595S
- Batsis JA, Nieto-Martinez RE, Lopez-Jimenez F. *Metabolic syndrome: from global epidemiology to individualized medicine*. Clin Pharmacol Ther. 2007 Nov;82(5):509-24
- Benyshek DC, Johnston CS, Martin JF. *Glucose metabolism is altered in the adequately-nourished grand-offspring (F3 generation) of rats malnourished during gestation and perinatal life*. Diabetologia. 2006 May;49(5):1117-9
- Berg JM, Tymoczki JL, Stryer L. *Biochemistry 5<sup>th</sup> edition*. New York: WH Freeman; 2002
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. *An operational definition of epigenetics*. Genes Dev. 2009 Apr 1;23(7):781-3
- Boullu-Ciocca S, Dutour A, Guillaume V, Achard V, Oliver C, Grino M. *Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome*. Diabetes. 2005 Jan;54(1):197-203
- Bouskila M, Hirshman MF, Jensen J, Goodyear LJ, Sakamoto K. *Insulin promotes glycogen synthesis in the absence of GSK3 phosphorylation in skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008 Jan;294(1):E28-35

- Bulfin LJ, Clarke MA, Buller KM, Spencer SJ. *Anxiety and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to psychological stress are attenuated in male rats made lean by large litter rearing*. Psychoneuroendocrinology. 2011 Aug;36(7):1080-91
- Burdge GC, Lillycrop KA. *Nutrition, epigenetics, and developmental plasticity: implications for understanding human disease*. Annu Rev Nutr. 2010 Aug 21;30:315-39
- Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S. *Longevity determined by paternal ancestors' nutrition during their slow growth period*. Acta Biotheor. 2001 Mar;49(1):53-9
- Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock C, Li C, Gu H, Zamore PD, Meissner A, Weng Z, Hofmann HA, Friedman N, Rando OJ. *Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals*. Cell. 2010 Dec 23;143(7):1084-96
- Cerda S, Weitzman SA. *Influence of oxygen radical injury on DNA methylation*. Mutat Res. 1997 Apr;386(2):141-52.
- Charlton M. *Nonalcoholic fatty liver disease: a review of current understanding and future impact*. Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2004; 2:1048–1058
- Chen TH, Chiu YH, Boucher BJ. *Transgenerational effects of betel-quid chewing on the development of the metabolic syndrome in the Keelung Community-based Integrated Screening Program*. Am J Clin Nutr. 2006 Mar;83(3):688-92
- Cherrington A, Sindelar D, Edgerton D, Steiner K, McGuinness O- *Physiological consequences of phasic insulin release in the normal animal*. Diabetes. 2002; 51 (Suppl. 1):S103 –S108
- Cohen B, Novick d, Rubinstein m. *Modulation of Insulin Activities by leptin*. Science 1996; 274: 1185-1188
- Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, Van Pelt RE, Wang H, Eckel RH. *The metabolic syndrome*. Endocr Rev. 2008 Dec;29(7):777-822
- Davidowa H, Plagemann A. *Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats*. Neuroreport. 2007 Mar 26;18(5):521-4
- Davies PS, Day JM, Lucas A. *Energy expenditure in early infancy and later body fatness*. Int J Obes. 1991 Nov;15(11):727-31.
- De Moura EG, Bonomo IT, Nogueira-Neto JF, de Oliveira E, Trevenzoli IH, Reis AM, Passos MC, Lisboa PC. *Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny*. J Physiol. 2009 Oct 15;587(Pt 20):4919-29
- Del Prato S, Marchetti P, Bonadonna RC. *Phasic insulin release and metabolic regulation in type 2 diabetes*. Diabetes. 2002 Feb;51 Suppl 1:S109-16

- Dumus B, Mook-Kanamori DO, Holzhauser S, Hofman A, van der Beek EM, Boehm G, Steegers EA, Jaddoe VW. *Growth in foetal life infancy is associated with abdominal adiposity at the age of 2 years: the generation R study*. Clin Endocrinol (Oxf). 2010 May;72(5):633-40
- Dunn GA, Bale TL. *Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice*. Endocrinology. 2009 Nov;150(11):4999-5009
- Dunn GA, Bale TL. *Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage*. Endocrinology. 2011 Jun;152(6):2228-36
- Eckel RH, Alberti KG, Grundy SM, Zimmet PZ. *The metabolic syndrome*. Lancet. 2010 Jan 16;375(9710):181-3
- Erickson B, Selvan SP, Ko KW, Kelly K, Quiroga AD, Li L, Nelson R, King-Jones K, Jacobs RL, Lehner R. *Endoplasmic reticulum-localized hepatic lipase decreases triacylglycerol storage and VLDL secretion*. Biochim Biophys Acta. 2013 Jun;1831(6):1113-23
- Fisher SJ, Kahn CR. *Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production*. J Clin Invest. 2003; 111:463–468
- Gallou-Kabani C, Junien C. *Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic*. Diabetes. 2005 Jul;54(7):1899-906
- Gerich JE. *Is reduced first-phase insulin release the earliest detectable abnormality in individuals destined to develop type 2 diabetes?* Diabetes. 2002 Feb;51 Suppl 1:S117-21
- Girard J. *Insulin's effect on the liver: "direct or indirect?" continues to be the question*. J Clin Invest. 2006 Feb;116(2):302-4
- Gluckman PD, Hanson MA, Morton SM, Pinal CS. *Life-long echoes--a critical analysis of the developmental origins of adult disease model*. Biol Neonate. 2005;87(2):127-39
- Gluckman PD, Hanson MA. *Changing times: the evolution of puberty*. Mol Cell Endocrinol. 2006 Jul 25;254-255:26-31
- Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. *Non-genomic transgenerational inheritance of disease risk*. Bioessays. 2007 Feb;29(2):145-54
- Gluckman PD, Hanson MA, Buklijas T, Low FM, Beedle AS. *Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases*. Nat Rev Endocrinol. 2009 Jul;5(7):401-8



- Gonzalez A, Merino B, Marroquí L, Neco P, Alonso-Magdalena P, Caballero-Garrido E, Vieira E, Soriano S, Gomis R, Nadal A, Quesada I. *Insulin hypersecretion in islets from diet-induced hyperinsulinemic obese female mice is associated to several functional adaptations in individual beta-cells*. Endocrinology. 2013 Jul 18
- Grundy SM. *Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease*. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Jun;89(6):2595-600
- Grundy SM. *Metabolic syndrome pandemic*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 Apr;28(4):629-36
- Gupta D, Krueger CB, Lastra G. *Over-nutrition, obesity and insulin resistance in the development of  $\beta$ -cell dysfunction*. Curr Diabetes Rev. 2012 Mar;8(2):76-83.
- Habbout A, Guenancia C, Lorin J, Rigal E, Fassot C, Rochette L, Vergely C. *Postnatal overfeeding causes early shifts in gene expression in the heart and long-term alterations in cardiometabolic and oxidative parameters*. PLoS One. 2013;8(2):e56981
- Hall JE, Brands MW, Zappe DH, Alonso Galicia M. *Insulin resistance, hyperinsulinemia, and hypertension: causes, consequences, or merely correlations?* Proc Soc Exp Biol Med. 1995 Apr;208(4):317-29
- Herman WH. *Diabetes epidemiology: guiding clinical and public health practice: the Kelly West Award Lecture, 2006*. Diabetes Care. 2007 Jul;30(7):1912-9. Epub 2007 May 11
- Hosokawa YA, Hosokawa H, Chen C, Leahy JL. *Mechanism of impaired glucose-potentiated insulin secretion in diabetic 90% pancreatectomy rats. Study using glucagon-like-peptide-1 (7-37)*. J Clin Invest. 1996 Jan 1;97(1):180-6
- Hu FB. *Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes*. Diabetes Care. 2011 Jun;34(6):1249-57
- Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, Peters AL, Tsapas A, Wender R, Matthews DR. *Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach. Position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)*. Diabetologia. 2012 Jun;55(6):1577-96

- Jablonka E, Lamb MJ. *Epigenetic Inheritance and Evolution: the Lamarckian Dimension*. Vol. Oxford University Press; 1995.
- Jablonka E, Raz G. *Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution*. Q Rev Biol. 2009;84:131–76
- Jimenez-Chillaron JC, Hernandez-Valencia M, Reamer C, Fisher S, Joszi A, Hirshman M, Oge A, Walrond S, Przybyla R, Boozer C, Goodyear LJ, Patti ME. *Beta-cell secretory dysfunction in the pathogenesis of low birth weight-associated diabetes: a murine model*. Diabetes. 2005 Mar;54(3):702-11
- Jimenez-Chillaron JC, Patti ME. To catch up or not to catch up: is this the question? Lessons from animal models. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2007 Feb;14(1):23-9
- Jimenez-Chillaron JC, Isganaitis E, Charalambous M, Gesta S, Pentinat-Pelegrin T, Faucette RR, Otis JP, Chow A, Diaz R, Ferguson-Smith A, Patti ME. *Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice*. Diabetes. 2009 Feb;58(2):460-8
- Jimenez-Chillaron JC, Díaz R, Martínez D, Pentinat T, Ramón-Krauel M, Ribó S, Plösch T. *The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health*. Biochimie. 2012 Nov;94(11):2242-63
- Jirtle RL, Skinner MK. *Environmental epigenomics and disease susceptibility*. Nat Rev Genet. 2007 Apr;8(4):253-62
- Johnson AM, Olefsky JM. *The origins and drivers of insulin resistance*. Cell. 2013 Feb 14;152(4):673-84
- Julius U. *Influence of plasma free fatty acids on lipoprotein synthesis and diabetic dyslipidemia*. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2003 Aug;111(5):246-50
- Juonala M, Magnussen CG, Berenson GS, Venn A, Burns TL, Sabin MA, Srinivasan SR, Daniels SR, Davis PH, Chen W, Sun C, Cheung M, Viikari JS, Dwyer T, Raitakari OT. *Childhood adiposity, adult adiposity, and cardiovascular risk factors*. N Engl J Med. 2011 Nov 17;365(20):1876-85.
- Kaati G, Bygren LO, Edvinsson S. *Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period*. Eur J Hum Genet. 2002 Nov;10(11):682-8
- Kaati G, Bygren LO, Pembrey M, Sjöström M. *Transgenerational response to nutrition, early life circumstances and longevity*. Eur J Hum Genet. 2007 Jul;15(7):784-90

- Karbowska J, Kochan Z. *Leptin as a mediator between obesity and cardiac dysfunction*. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2012 May 23;66:267-74
- Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, Bajaj M, Mandarinou L, DeFronzo R, Cusi K. *A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes*. Diabetes. 2003 Oct;52(10):2461-74
- Kirkman MS, Shankar RR, Shankar S, Shen C, Brizendine E, Baron A, McGill J. *Treating postprandial hyperglycemia does not appear to delay progression of early type 2 diabetes: the Early Diabetes Intervention Program*. Diabetes Care. 2006 Sep;29(9):2095-101.
- Klop B, Elte JW, Cabezas MC. *Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets*. Nutrients. 2013 Apr 12;5(4):1218-40
- Koyama K, Chen G, Lee Y, Unger RH. *Tissue triglycerides, insulin resistance and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity*. American Journal of Physiology 273 (4 Pt 1): E708-13
- Kuchinskiene Z, Carlson LA. *Composition, concentration, and size of low density lipoproteins and of subfractions of very low density lipoproteins from serum of normal men and women*. J Lipid Res 1982;23:762-9
- Laaksonen DE, Lakka HM, Niskanen LK, Kaplan GA, Salonen JT, Lakka TA. *Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study*. Am J Epidemiol. 2002 Dec 1;156(11):1070-7
- Laclaustra Gimeno M, Bergua Martínez C, Pascual Calleja I, Casanovas Lenguas JA. *Síndrome metabólico. Concepto y fisiopatología*. Rev Esp Cardiol. 2005;5(Supl D):3-10. - Vol. 5 Núm.Supl.D
- Langley-Evans SC. *Developmental programming of health and disease*. Proc Nutr Soc. 2006 Feb;65(1):97-105
- Lann D, LeRoith D. *Insulin resistance as the underlying cause for the metabolic syndrome*. Med Clin North Am. 2007 Nov;91(6):1063-77, viii
- Leunissen RW, Kerkhof GF, Stijnen T, Hokken-Koelega A. *Timing and tempo of first-year rapid growth in relation to cardiovascular and metabolic risk profile in early adulthood*. JAMA. 2009 Jun 3;301(21):2234-42
- Levine S, Saltzman A. *A procedure for inducing sustained hyperlipemia in rats by administration of a surfactant*. J Pharmacol Toxicol Methods. 2007 Mar-Apr;55(2):224-6

- Li G, Kohorst JJ, Zhang W, Laritsky E, Kunde-Ramamoorthy G, Baker MS, Fiorotto ML, Waterland RA. *Early postnatal nutrition determines adult activity and energy expenditure in female mice*. Diabetes. 2013 Aug;62(8):2773-83
- Lillicrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. *Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring*. J Nutr. 2005 Jun;135(6):1382-6
- Lima Nda S, de Moura EG, Passos MC, Nogueira Neto FJ, Reis AM, de Oliveira E, Lisboa PC. *Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring*. Br J Nutr. 2011 May;105(9):1405-13
- Ling C, Groop L. *Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes*. Diabetes. 2009 Dec;58(12):2718-25
- Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV Jr, Ory DS, Schaffer JE. *Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2003;100:3077-3082
- Lucas A. *Growth and later health: a general perspective*. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program. 2010;65:1-9; discussion 9-11
- Luquez HA. *Evolución conceptual del síndrome metabólico*. Cátedra de clínica médica. Hospital San Roque, Facultad Ciencias Médicas. Universidad de Córdoba. Septiembre 2004
- Martins MR, Vieira AK, de Souza EP, Moura AS. *Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice*. J Endocrinol. 2008 Sep;198(3):591-8
- Martin-Gronert MS, Ozanne SE. *Metabolic programming of insulin action and secretion*. Diabetes Obes Metab. 2012 Oct;14 Suppl 3:29-39
- Martin-Gronert MS, Ozanne SE. *Early life programming of obesity*. Med Wieku Rozwoj. 2013 Jan-Mar;17(1):7-12
- McGill HC Jr. *Nutrition in early life and cardiovascular disease*. Curr Opin Lipidol. 1998 Feb;9(1):23-7
- McMillen IC, Robinson JS. *Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming*. Physiol Rev. 2005 Apr;85(2):571-633
- Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM, Guyton JR. *Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms*. Am Heart J. 2005 Jan;149(1):33-45
- Mohn F, Schubeler D. *Genetics and epigenetics: stability and plasticity during cellular differentiation*. Trends Genet. 2009;25:129-36

- Monetti M, Levin MC, Watt MJ, Sajan MP, Marmor S, Hubbard BK, Stevens RD, Bain JR, Newgard CB, Farese RV Sr, Hevener AL, Farese RV Jr. *Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver*. Cell Metab. 2007;6:69–78
- Montanya E, Tellez N. *Pancreatic remodeling: beta-cell apoptosis, proliferation and neogenesis, and the measurement of beta-cell mass and of individual beta-cell size*. Methods MolBiol. 2009; 560:137-158
- Nätt D, Lindqvist N, Stranneheim H, Lundeberg J, Torjesen PA, Jensen P. *Inheritance of acquired behaviour adaptations and brain gene expression in chickens*. PLoS One. 2009 Jul 28;4(7):e6405
- Neu J, Hauser N, Douglas-Escobar M. *Postnatal nutrition and adult health programming*. Semin Fetal Neonatal Med. 2007 Feb;12(1):78-86
- Newgard CB, Lu D, Jensen MV, Schissler J, Boucher A, Burgess S, Sherry AD. *Stimulus/secretion coupling factors in glucose-stimulated insulin secretion: insides gained from a multidisciplinary approach*. Diabetes. 2002 Dec;51 Suppl 3:S389-93
- Nuyt AM, Szyf M. *Developmental programming through epigenetic changes*. Circ Res. 2007 Mar 2;100(4):452-5
- Okosun IS, Liao Y, Rotimi CN, Prewitt TE, Cooper RS. *Abdominal adiposity and clustering of multiple metabolic syndrome in White, Black and Hispanic americans*. Ann Epidemiol. 2000 Jul;10(5):263-70
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. *Adipokines in inflammation and metabolic disease*. Nat Rev Immunol. 2011 Feb;11(2):85-97
- Ozarda Y, tuncer GO Gunes Y Eroz E. *Serum levels of leptin, adiponectin and resistin are interrelated and related to total antioxidant capacity, free fatty acids and phospholipids in early neonatal life*. Clin Biochem. 2012 Mar;45(4-5):298-302
- Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA. *Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1*. J Clin Invest. 2008 Jun;118(6):2316-24
- Patel MS, Srinivasan M, Laychock SG. *Metabolic programming: Role of nutrition in the immediate postnatal life*. J Inherit Metab Dis. 2009 Apr;32(2):218-28
- Patel MS, Srinivasan M. *Metabolic programming due to alterations in nutrition in the immediate postnatal period*. J Nutr. 2010 Mar;140(3):658-61.

- Patel MS, Srinivasan M. *Metabolic programming in the immediate postnatal life.* Ann Nutr Metab. 2011;58 Suppl 2:18-28
- Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S, Northstone K, Sjöström M, Golding J; ALSPAC Study Team. *Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans.* Eur J Hum Genet. 2006 Feb;14(2):159-66
- Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS. *Adipocytokines and insulin resistance.* J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 447-52
- Plagemann A, Heidrich I, Götz F, Rohde W, Dörner G. *Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding.* Exp Clin Endocrinol. 1992;99(3):154-8
- Plagemann A, Harder T, Rake A, Waas T, Melchior K, Ziska T, Rohde W, Dörner G. *Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats.* J Neuroendocrinol. 1999 Jul;11(7):541-6
- Plagemann A. *Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake.* Horm Res. 2006;65 Suppl 3:83-9
- Plagemann A, Roepke K, Harder T, Brunn M, Harder A, Wittrock-Staar M, Ziska T, Schellong K, Rodekamp E, Melchior K, Dudenhausen JW. *Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding.* J Perinat Med. 2010 Jul;38(4):393-400
- Plagemann A, Harder T, Schellong K, Schulz S, Stupin JH. *Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2012 Oct;26(5):641-53
- Plagemann A, Harder T, Brunn M, Harder A, Roepke K, Wittrock-Staar M, Ziska T, Schellong K, Rodekamp E, Melchior K, Dudenhausen JW. *Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome.* J Physiol. 2009 Oct 15;587(Pt 20):4963-76
- Postic C, Girard J. *Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice.* J Clin Invest. 2008 Mar;118(3):829-38
- Prentki M, Madiraju SR. *Glycerolipid /free fatty acid cycle and beta cell function in health, obesity and diabetes.* Mol Cell Endocrinol. 2012 Apr 28;353(1-2):88-100
- Quan W, Jo EK, Lee MS. *Role of pancreatic  $\beta$ -cell death and inflammation in diabetes.* Diabetes Obes Metab. 2013 Sep;15 Suppl 3:141-51

- Ramlo-Halsted BA, Edelman SV. *The natural history of type 2 diabetes. Implications for clinical practice.* Prim Care. 1999 Dec;26(4):771-89
- Reaven GM. Banting lecture 1998. *Role of insulin resistance in human disease.* Diabetes. 1998 Dec; 37(12):1595-607
- Reaven GM. *Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease.* Panminerva Med. 2005 Dec;47(4):201-10
- Rees WD, Hay SM, Brown DS, Antipatis C, Palmer RM. *Maternal protein deficiency causes hypermethylation of DNA in the livers of rat fetuses.* J Nutr. 2000 Jul;130(7):1821-6.
- Rinella M.E., Green R.M. *The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance.* J. Hepatol. 2004;40:47–51
- RoachPJ. *Glycogen and its metabolism.* Curr Mol Med. 2002; 2: 101–120
- Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MC, Trevenzoli IH, da Conceição EP, Bonono IT, Neto PC, Lisboa JF . *Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS expression and lower STAT3 activity in adult rats.* J Nutr Biochem. 2011 Feb;22(2):109-17
- Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. *Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans.* Journal of Clinical Investigation 97 (12): 2859–2865
- Rubinfeld M, Brook RD. *HDL cholesterol and cardiovascular outcomes: what is the evidence?* Curr Cardiol Rep. 2013 Apr;15(4):349
- Ruotolo G, Howard BV. *Dyslipidemia of the metabolic syndrome.* Curr Cardiol Rep. 2002. Nov; 4(6):494-500
- Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH, Piersma AH, Ozanne SE, Twinn DF, Remacle C, Rowlerson A, Poston L, Taylor PD. *Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming.* Hypertension. 2008 Feb;51(2):383-92
- Scheen AJ, Luyckx FH. *Metabolic syndrome: definitions and epidemiological data.* Rev Med Liege. 2003 Jul-Aug;58(7-8):479-84
- Schinner, S; Scherbaum, WA; Bornstein, SR; Barthel, A. *Molecular mechanisms of insulin resistance.* Diabetic Medicine. 2005; 22 (6): 674–682
- Sesti G. *Pathophysiology of insulin resistance.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2006 Dec;20(4):665-79

- Shanik MH, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y, Roth J. *Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse?* Diabetes Care. 2008 Feb;31 Suppl 2:S262-8
- Sharma A, Singh P. *Detection of transgenerational spermatogenic inheritance of adult male acquired CNS gene expression characteristics using a Drosophila systems model.* PLoS One. 2009 Jul 28;4(7):e6405
- Shaw J. *Diabetes, síndrome metabólico y epidemia cardiovascular.* Diabetes Voice. Mayo 2006; Vol 51. p25
- Singhal A, Kennedy K, Lanigan J, Fewtrell M, Cole TJ, Stephenson T, Elias-Jones A, Weaver LT, Ibbanesebhor S, MacDonald PD, Bindels J, Lucas A. *Nutrition in infancy and long-term risk of obesity: evidence from 2 randomized controlled trials.* Am J Clin Nutr. 2010 Nov;92(5):1133-44
- Smith DO, LeRoith D. *Insulin resistance syndrome, pre-diabetes, and the prevention of type 2 diabetes mellitus.* Clin Cornerstone. 2004;6(2):7-6
- Song F, Mahmood S, Ghosh S, Liang P, Smiraglia DJ, Nagase H, Held WA. *Tissue specific differentially methylated regions (TDMR); Changes in DNA methylation during development.* Genomics. 2009 Feb;93(2):130-9
- Spencer SJ, Tilbrook A. *Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness.* Psychoneuroendocrinology. 2009 Sep;34(8):1133-43
- Stefanidis A, Spencer SJ. *Effects of neonatal overfeeding on juvenile and adult feeding and energy expenditure in the rat.* PLoS One. 2012;7(12):e52130
- Steiner G, Schwartz L, Shumak S, Poapst M. *The association of increased levels of intermediate-density lipoproteins with smoking and with coronary artery disease.* Circulation. 1987 Jan;75(1):124-30
- Stofkova A. *Leptin and adiponectin: from energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity.* Endocr Regul. 2009 Oct;43(4):157-68
- Storlien LH. *Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats.* Diabetes. 1991; 40 (2):280-289
- Turner S, Voogt J, Davidson M, Glass A, Killion S, Decaris J, Mohammed H, Minehira K, Boban D, Murphy E, Luchoomun J, Awada M, Neese R, Hellerstein M. *Measurement of reverse cholesterol transport pathways in humans: in vivo rates of free cholesterol efflux, esterification, and excretion.* J Am Heart Assoc. 2012 Aug;1(4):e001826
- Tzoulaki I, Sovio U, Pillas D, Hartikainen AL, Pouta A, Laitinen J, Tammelin TH, Jarvelin MR, Elliott P. *Relation of immediate postnatal growth with obesity and related metabolic risk factors in adulthood: the northern Finland birth cohort 1966 study.* Am J Epidemiol. 2010 May 1;171(9):989-98



- Veenendaal MV, Painter RC, de Rooij SR, Bossuyt PM, van der Post JA, Gluckman PD, Hanson MA, Roseboom TJ. *Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine*. BJOG. 2013 Apr;120(5):548-53
- Voshol PJ, Havinga R, Wolters H, Ottenhoff R, Princen HM, Oude Elferink RP, Groen AK, Kuipers F. *Reduced plasma cholesterol and increased fecal sterol loss in multidrug resistance gene 2 glycoprotein deficient mice*. Gastroenterology. 1998 May;114(5):1024-34
- Wadhwa PD, Buss C, Entringer S, Swanson JM. *Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms*. Semin Reprod Med. 2009 Sep;27(5):358-68
- Wang XM. *Early life programming and metabolic syndrome*. World J Pediatr. 2013 Feb;9(1):5-8
- Wang X, Dong Y, Qi X, Huang C, Hou L. *Cholesterol levels and risk of hemorrhagic stroke: a systematic review and meta-analysis*. Stroke. 2013 Jul;44(7):1833-9
- Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K. *Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance*. Nutrients. 2013 Sep 23;5(9):3757-78
- Weaver IC, Champagne FA, Brown SE, Dymov S, Sharma S, Meaney MJ, Szyf M. *Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life*. J Neurosci. 2005 Nov 23;25(47):11045-54.
- Weaver IC, Meaney MJ, Szyf M. *Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 28;103(9):3480-5
- Weibel ER. *Point counting methods*. Stereological Methods: Academic press, 1979, p. 101 –161
- Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. *Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance*. Diabetologia. 2000 Dec;43(12):1498-506
- Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX, Diehl AM. *Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology. 2007;45:1366–1374
- Youngson NA, Whitelaw E. *Transgenerational epigenetic effects*. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2008;9:233-57

Zambrano E, Martínez-Samayoa PM, Bautista CJ, Deás M, Guillén L, Rodríguez-González GL, Guzmán C, Larrea F, Nathanielsz PW. *Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation.* J Physiol. 2005 Jul 1;566(Pt 1):225-36. Epub 2005 Apr 28.

Zamora-Valdés d, Chávez-Tapia NC, Méndez-Sánchez N. *Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina.* Vol. 11 Num 3 Medica sur Sociedad de Medicos

Zavaroni I, Dall'Aglio E, Bonora E, Alpi O, Passeri M, Reaven GM. *Evidence that multiple risk factors for coronary artery disease exist in persons with abnormal glucose tolerance.* Am J Med. 1987 Oct;83(4):609-12



## **ANNEX 1**



## ENCEBADORS

	5'-3'	3'-5'
Acc1	tggatccgcttacagagagact	gccgggacatctcattcg
Acc2	ccagtcttccgtgcctttgtac	ctcatccctcgctctgaacg
Actin b	agtgtgacgttgacatccgt	ccaccgatccacacagagta
AP2	caaaatgtgtgatgfcctt	ctcttctttggctcatgcc
CEBPa	agccgagataaagccaaaca	agcgaccctaaccatcctc
Cpt1a	ctcagtgggagcgactcttca	ggcctctgtggtacacgaca
Cpt1b	ccagatggagaggatgttcaaca	agaagcgacctttgtggtagaca
Cpt2	cagtgcacagaagcctctcttg	cttccaatgccgttctcaa
Fabp5	caaaaccgagagcacagtga	ccctcattgcaccttctcat
Fasn	ctgaagagcctggaagatcg	gtcacacacctgggagaggt
G6Pase	tccggaggctggcattgta	gtgcagctgaacgtctgtctg
HNF4a	ccgggtgtcaggaacagttg	tgcaggacagctgagcctatc
IL6	ctgcaagagacttccatccagt	gaagtagggaaggccgtgg
Leptin	ggctttggtcctatctgtcttatgttc	ccctctgcttggcggatacc
MCP1	tcccaatgagtaggctggag	aagtgcttgagggtgtgtg
Pck	cagtttcgttcgacctgcgta	Ggaaccagttgacatggaag
PGC1a	Ccgtaaatctgcgggatgatg	gcatggggtgtttgtaggag
Ppara	tattcggctgaagctggtgtac	ctggcattgttccggttct
Pparg	Cacaatgccatcaggtttgg	gctggtcgatatcactggagatc
RxRa	gagcccaagactgagacatacgt	cccactccacaagagtgaagag
Scd1	atgtccaagagatctccagttct	cttcaccttctctgcttattcc
Srebf1	ggagccatggattgcacatt	cctgtctcacccccagcata
TNFa	ccagtgtggaagctgtctt	aagcaaaagaggaggcaaca

## **BUFFERS**

### LYSIS BUFFER STOCK 1.8X

50 mM	Tris base pH 7.4
150 mM	NaCl
Ajustar pH a 7.4 amb HCl	
1%	NP-40
2mM	EDTA
10 mM	Sodium-beta-glicerophosphate
2 mM	EGTA
5 mM	Sodium pyrophosphate
[guardar a 4º]	

Afegir fresc per 1 ml:

566 ul	Stock 1.8X
11.1 ul	1mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
142 ul	1x Protease inhibitor Cocktail
5ul 200 mM	1mM PMSF
250 ul 200 ml	50 mM NaF
27 ul 0.9 M	25 mM NEM
0.1%	beta-Metcaptoethanol

### BUFFER D'ELECTROFORESI 10X

25 mM	Tris
192 mM	Glycine
1%	SDS

### BUFFER D'ELECTROTRANSFERÈNCIA 10X

25 mM	Tris
192 mM	Glycine
20%	Methanol

# ANTICOSSOS

ANTICÒS	PES MOLECULAR	REFERÈNCIA	DILUCIÓ	ANTICÒS SECUNDARI
<b>Akt</b>	60 kDa	Akt #9272 Cell Signaling	1:1000	Conill mAb
<b>pAkt</b>	60 kDa	Phospho-Akt (Ser473) (587F11) #4051 Cell Signaling	1:1000	Ratolí mAb
<b>Gsk3 a/b</b>	46-51 kDa	Anti-GSK- a/b #05-903 Millipore	1:1000	Conill mAb
<b>pGsk3</b>	46-51 kDa	Phospho-Gsk3 #93315 Cell Signaling	1:1000	Conill mAb
<b>Actina b</b>	42 kDa	Anti-b-Actin Clone AC-74 A5316 Sigma-Aldrich	1:10000	Ratolí mAb





## **ANNEX 2**



## Transgenerational Inheritance of Glucose Intolerance in a Mouse Model of Neonatal Overnutrition

Thais Pentinat, Marta Ramon-Krauel, Judith Cebria, Ruben Diaz, and Josep C. Jimenez-Chillaron

Research, Fundacio Sant Joan de Deu (T.P., J.C., J.C.J.-C.), and Endocrine Division, Hospital Sant Joan de Deu (M.R.-K., R.D., J.C.J.-C.), Barcelona 08950, Spain; and Endocrine Division (R.D., J.C.J.-C.), Children's Hospital Boston and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115

Epidemiological and clinical data show that rapid weight gain early in life is strongly associated with several components of the metabolic syndrome. Strikingly, abnormal growth rates in early life can additionally influence diabetes risk in subsequent generations. Here we aim to study whether neonatal overgrowth induces diabetes in offspring and grand-offspring of affected individuals using a mouse model of neonatal overfeeding. We induced neonatal overgrowth (ON-F0) by culling offspring to four pups per dam during lactation. By age 4 months, ON-F0 mice developed many features of the metabolic syndrome, including obesity, insulin resistance, and glucose intolerance. We then studied whether male offspring (ON-F1) and grand-offspring (ON-F2) of ON-F0 male mice, which were not overfed during lactation, developed features of the metabolic syndrome with aging. ON-F1 mice developed fed and fasting hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, insulin resistance, and glucose intolerance, but not obesity, by age 4 months. In contrast, ON-F2 male mice showed a more moderate phenotype and only developed fasting hyperglycemia and glucose intolerance by age 4 months. Impaired glucose tolerance in ON-F1 and ON-F2 mice appeared to be accounted for primarily by peripheral insulin resistance, because beta-cell function remained normal or even increased in these cohorts. Nutritional challenges occurring during sensitive periods of development may have adverse metabolic consequences well beyond the lifespan of affected individuals and manifest in subsequent generations. Transgenerational progression of metabolic phenotypes through the male lineage supports a potential role for epigenetic mechanisms in mediating these effects. (*Endocrinology* 151: 5617–5623, 2010)

Epidemiological and clinical data show that rapid weight gain early in life is strongly associated with several components of the metabolic syndrome, including cardiovascular disease, type 2 diabetes, and obesity (1–5). Overfeeding is the primary mediator of rapid neonatal weight gain (1). Human data are further supported by experimental models: neonatal overfeeding in rats promotes rapid weight gain and programs many features of the metabolic syndrome later in life (6, 7). Importantly, in these experimental paradigms, animals are maintained on a controlled standard chow diet from weaning onward, demonstrating that early overfeeding/overgrowth *per se* increases risk of late-onset chronic diseases.

In addition, recent epidemiological evidence suggests that abnormal nutrition in early life can influence diabetes risk in subsequent generations (8). It has been shown that augmented food availability during the slow prepubertal growth period in grandfathers increases the risk of cardiovascular and diabetes-related deaths in their grandsons (9–12). The authors suggest that there exists a sex-specific male-lineage transgenerational inheritance of disease risk. While mechanisms are unclear, and genetic contributions from the Y chromosome cannot completely be ruled out, epigenetic mechanisms might explain such transgenerational effects. Nevertheless, better understanding of mechanisms linking neonatal growth with late-onset disease,

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170  
Printed in U.S.A.

Copyright © 2010 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/en.2010-0684 Received June 18, 2010. Accepted September 10, 2010.

First Published Online October 13, 2010

Abbreviations: F0, Parental generation; F1, first generation offspring; F2, second generation offspring; HOMA-IR, homeostatic model assessment–insulin resistance; ipGTT, intraperitoneal glucose tolerance tests; NEFA, nonesterified fatty acids; ON, overnutrition.

and transgenerational effects, is curtailed, in part, by lack of appropriate animal models.

We created a mouse model of neonatal overfeeding and accelerated early growth rate (ON-F0) that develops insulin resistance, glucose intolerance, and diabetes by age 6 months. The aim of this work was to explore whether the risk of obesity, insulin resistance, and other features of the metabolic syndrome is carried to their offspring and grand-offspring via the paternal lineage. We show, for the first time, that male offspring and grand-offspring of ON-F0 male mice also develop insulin resistance and glucose intolerance with aging. Transgenerational progression of metabolic phenotypes through the paternal lineage supports a potential role for epigenetic mechanisms in mediating these effects.

## Materials and Methods

### Animal care and experimental design

Protocols were approved by the Universitat de Barcelona Animal Care and Use Committee. ICR mouse strain (ICR-CD1, Harlan Laboratories, Italy) was chosen for this study based on its fast somatic growth, especially during the neonatal period. Besides, ICR mice have been previously shown to be a valid model to understand the association between neonatal growth and adult metabolism (5, 17, 18). Eight-week-old virgin females were mated with not sibling males. Upon confirmation of pregnancy, females were housed individually with *ad lib* access to standard chow (2014 Teklad Global, Harlan Iberica, Barcelona, Spain). After delivery, litter size was adjusted to eight pups (control group, C) or four pups per dam (overnutrition group, ON). Both C and ON offspring are designated as the parental generation, F0 (Fig. 2A). F0 pups were nursed freely and weaned at 3 weeks onto standard chow, provided *ad libitum*. At weaning, C and ON mice were housed in groups of six mice per cage. C and ON males from the F0 generation were mated at age 3 months with external control virgin females, provided by the vendor (Harlan), to generate the first generation-offspring, F1 (Fig. 2A). All females had the same average weight and age (8–10 wk) to avoid potential metabolic biases, due to maternal effects, in the offspring (Supplemental Fig. 1 published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>). Likewise, male breeders for each crossing were randomly selected to guarantee an unbiased representation for each experimental group (Supplemental Fig. 1). During the mating process we kept one male with one single female. After confirmation of pregnancy by vaginal plug, the male was removed from the cage and the female was maintained individually throughout gestation. At birth, all litters are adjusted to eight pups per dam. Thus, contrary to the parental generation, ON-F1 pups are not neonatally overfed compared with their matched controls. We next repeated the breeding protocol, by using C-F1 and ON-F1 males, to obtain the second-generation offspring, F2 (Fig. 2A). Likewise, all litters are equalized to 8 pups per dam to match normal nutrition during the neonatal period. At weaning all mice have free access to standard chow.

In this study, we focus on the metabolic analysis of males only, because paternally-induced transgenerational effects should be

mediated, primarily, by epigenetic mechanisms. In contrast, maternally-induced transgenerational effects might be mediated by a complex interplay between metabolic, mitochondrial and epigenetic modifications.

Neonatal food intake was determined in 4-d-old neonates as described (13). Briefly, at 0900 the whole litter was isolated from the mother, and neonates were fasted for three hours. To avoid hypothermia, neonates were maintained on a thermal electric blanket during this period. After the 3-hour fasting, mice were weighed accurately on a high precision scale and reintroduced with the mother for 1 h. After the 1-h refeeding period, neonates were weighed again. Differences in body weight are a good estimate of food intake. Adult food intake was recorded from 4-month-old individual mice for five consecutive days. Food was weighed every 24 h, and the weight difference is a measure of daily food intake. Cumulative food intake is presented as the progressive accumulation of food consumed over the course of 5 d.

### Epididymal fat mass assessment

Fat mass was determined in 5-month-old mice. Epididymal fat depots were dissected and fat mass calculated as a percentage of wet tissue per whole body weight.

### In vivo metabolic testing

Intraperitoneal glucose (2 g/kg weight) tolerance tests (ipGTT) were performed in unrestrained conscious mice after a 12-h fast. Insulin release was assessed during the ipGTT as follows:  $\Delta\text{Insulin}_{30.0 \text{ min}} / \Delta\text{Glucose}_{30.0 \text{ min}}$ . Insulin sensitivity was determined by homeostatic model assessment–insulin resistance (HOMA-IR), as described (14, 15). HOMA is calculated by using both fasting glucose and insulin as follows:  $\text{HOMA-IR} = \text{Glucose} \times \text{Insulin} / 405$ , where glucose is given in mg/dl and insulin is given in  $\mu\text{U/ml}$ .

### Serum analysis

Insulin was measured by ELISA (Millipore, Spain). Blood glucose was measured with a Glucose Meter Elite (Menarini, Barcelona, Spain). Triglycerides, glycerol, and nonesterified fatty acids (NEFA) were measured using colorimetric methods on 2- $\mu\text{l}$  serum samples (BioVision, Madrid, Spain).

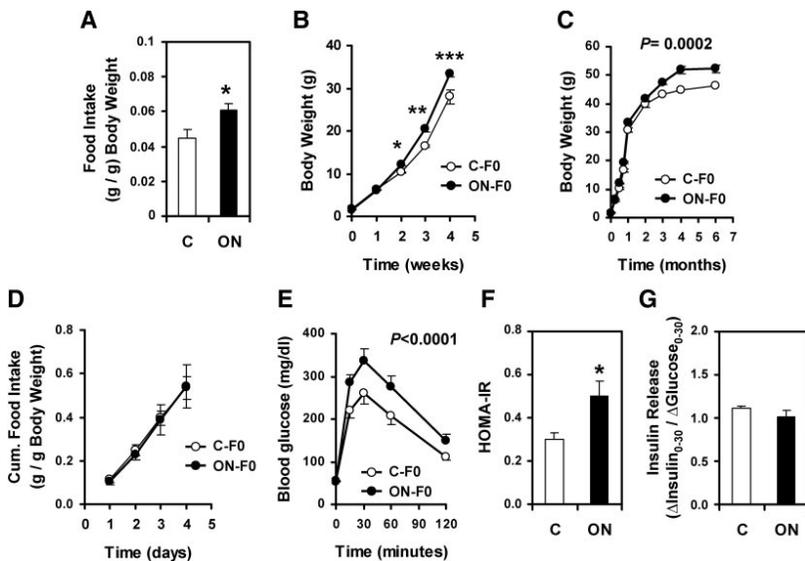
### Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using a two-tailed *t* test or a one-way ANOVA as indicated (IBM SPSS Statistics 19, Madrid, Spain). A *P* value  $< 0.05$  was considered significant.

## Results

### Neonatal accelerated growth programs metabolic syndrome in the adult

We show that neonatal overfeeding in ON-F0 male mice (Fig. 1A) led to accelerated postnatal weight gain during the first weeks of life (Fig. 1B). By age 2 weeks, ON-F0 mice were already heavier than controls (Fig. 1B); differences in body weight persisted until adulthood ( $P = 0.0002$ ) (Fig. 1C), despite normalization of food intake by age 4 months (Fig. 1D). Likewise, ON-F0 mice showed



**FIG. 1.** Physiological characterization of ON-F0 male mice. **A**, Neonatal food intake on 4-d-old mice.  $n \geq 6$  mice per group. **B**, Early postnatal growth from birth to age 4 weeks.  $n \geq 6$  mice per group. **C**, Body weight from birth until age 6 months.  $n \geq 20$  mice per group. **D**, Cumulative food intake in 4-month-old male mice over the course of 1 week.  $n \geq 6$  mice per group. **E**, Glucose tolerance test (2 g glucose/kg body weight) was performed in unrestrained 4-month-old male mice after an overnight fast.  $n \geq 14$  mice per group. **F**, HOMA-IR. Insulin sensitivity was assessed as follows:  $\text{HOMA-IR} = [\text{fasting insulin (mU/liter)} \times \text{fasting glucose (mg/dl)}] / 405$ .  $n \geq 14$  mice per group. **G**, Insulin released during the glucose tolerance test. Insulin release was measured as the ratio between insulin excursion from 0 to 30 min/ glucose excursion from 0 to 30 min.  $n \geq 8$  mice per group. Results in all panels are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*,  $P < 0.05$  vs. Control; \*\*\*,  $P < 0.001$  vs. Control (Student's *t* test). Statistical analysis between groups in panels C and E was evaluated by one-way ANOVA and included in the graph.  $P < 0.05$  was considered significant.

increased epididymal fat mass (Table 1). As expected, 4-month-old ON-F0 mice developed hypertriglyceridemia, fed and fasting hyperinsulinemia (Table 1), glucose intolerance ( $P < 0.0001$ ) (Fig. 1E), and insulin resistance (Fig. 1F). Because impaired glucose tolerance may result from insulin resistance and/or impaired insulin secretion, we further determined *in vivo*  $\beta$ -cell function and demonstrated that glucose-stimulated insulin release during the

glucose tolerance was preserved in ON-F0 mice compared with controls (Fig. 1G).

### Transgenerational effects of neonatal overfeeding

Next, we explored whether ON-F0 associated phenotypes are inherited by subsequent generations through the paternal lineage (Fig. 2A). Birth weight, sex distribution, litter size, and length of gestation of ON-F1 and ON-F2

**TABLE 1.** Growth data, glucose homeostasis, and hormonal data in 4-month-old male mice from F0, F1 and F2 generation offspring

	F0		F1		F2	
	C	ON	C	ON	C	ON
Epididymal fat mass (% body weight)	1.39 $\pm$ 0.18 (30)	2.67 $\pm$ 0.23** (22)	0.76 $\pm$ 0.09 (28)	0.52 $\pm$ 0.67* (29)	1.48 $\pm$ 0.22 (21)	1.69 $\pm$ 0.43 (12)
Glucose, random fed (mg/dl)	117.00 $\pm$ 2.87 (38)	158.90 $\pm$ 16.06** (24)	131.30 $\pm$ 4.31 (26)	115.90 $\pm$ 4.10 (26)	122.90 $\pm$ 4.59 (23)	129.10 $\pm$ 3.43 (13)
Glucose, fasted (mg/dl)	55.40 $\pm$ 2.31 (21)	56.40 $\pm$ 3.48 (22)	53.70 $\pm$ 2.10 (21)	86.30 $\pm$ 7.28* (11)	52.70 $\pm$ 2.32 (16)	64.90 $\pm$ 5.96* (13)
Insulin, random fed (ng/ml)	1.42 $\pm$ 0.30 (28)	6.06 $\pm$ 1.40*** (23)	1.57 $\pm$ 0.30 (14)	3.10 $\pm$ 0.77* (15)	0.87 $\pm$ 0.13 (23)	1.27 $\pm$ 0.28 (12)
Insulin, fasted (ng/ml)	0.17 $\pm$ 0.01 (13)	0.34 $\pm$ 0.12* (13)	0.27 $\pm$ 0.02 (11)	0.45 $\pm$ 0.06** (6)	0.14 $\pm$ 0.01 (10)	0.28 $\pm$ 0.08 (10)
TAG (nmol)	4.80 $\pm$ 1.03 (7)	16.30 $\pm$ 2.34*** (8)	4.97 $\pm$ 0.79 (8)	9.03 $\pm$ 0.79* (8)	4.58 $\pm$ 0.65 (11)	3.39 $\pm$ 0.19 (11)
NEFA (nmol)	13.46 $\pm$ 0.29 (8)	14.50 $\pm$ 1.26 (8)	14.02 $\pm$ 1.73 (8)	15.77 $\pm$ 1.70 (8)	13.45 $\pm$ 0.37 (12)	13.47 $\pm$ 0.46 (5)

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

\*,  $P < 0.05$  vs. Control; \*\*,  $P < 0.01$  vs. Control; \*\*\*,  $P < 0.001$  vs. Control (Student's *t* test). *n* value for each group is specified in the brackets.

mice were similar to controls (not shown). Likewise, neonatal food intake (not shown) and early postnatal growth of ON-F1 and ON-F2 male mice was normal when compared with control mice (Fig. 2B). Also, body weight of ON-F1 and ON-F2 mice was similar to controls until age 6 months (Fig. 2C).

Strikingly, some metabolic abnormalities in ON-F0 mice were inherited by subsequent generations. Indeed, 4-month-old ON-F1 male mice developed moderate fasting hyperglycemia, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia (Table 1). Likewise, ON-F1 mice showed insulin resistance and mild impaired glucose tolerance ( $P < 0.03$ ) when compared with controls (Fig. 2, D and E). Insulin release was actually increased in ON-F1 mice when compared with controls (Fig. 2F). These data suggest that, as in ON-F0 mice, glucose intolerance arises predominantly as a consequence of insulin resistance in ON-F1 mice. NEFA remained normal when compared with control mice (Table 1). Finally, and contrary to what happened to ON-F0 mice, fat mass was significantly reduced in ON-F1 mice (Table 1). Thus, we show that many, but not all, metabolic disturbances occurring in ON-F0 mice are inherited by the F1.

We next asked whether ON-F0 associated phenotypes are still present in the F2. At 4 months of age, ON-F2 male mice still exhibited mild fasting hyperglycemia (Table 1) and impaired glucose tolerance ( $P < 0.02$ ) (Fig. 2D). Similarly, ON-F2 male mice showed a nonstatistical trend for increased insulin resistance (Fig. 2E). By contrast, ON-F2 male mice exhibited normal serum triglycerides, NEFA, and insulin (Table 1). Likewise, fat mass and  $\beta$ -cell function remained normal compared with controls (Table 1, Fig. 2F). Thus, we show that only a small fraction of metabolic abnormalities occurring in ON-F0 and ON-F1 mice are transmitted to the F2.

## Discussion

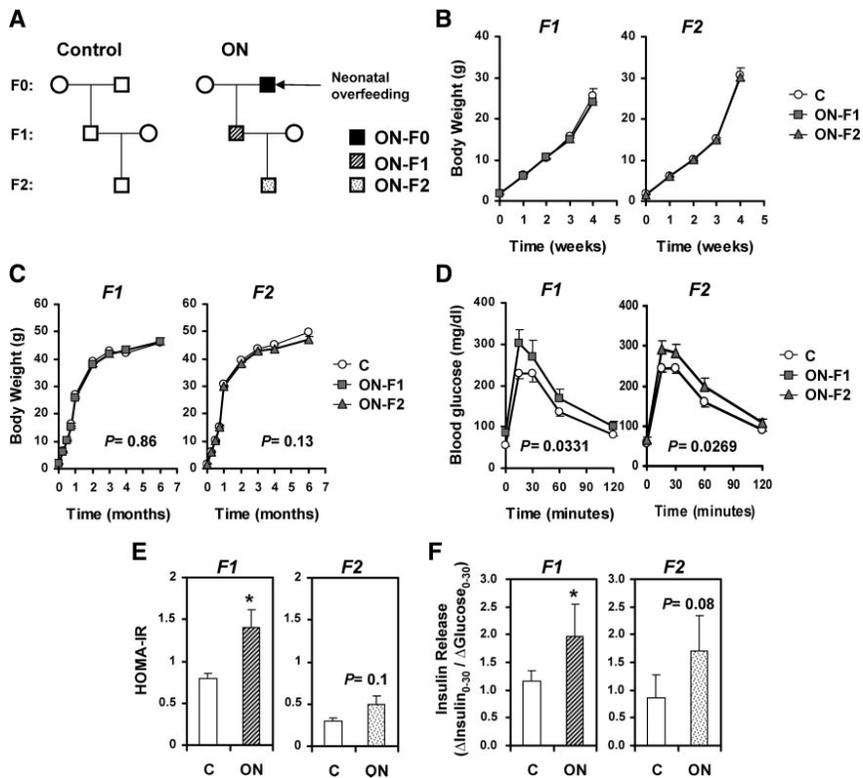
We have developed a mouse model of neonatal overnutrition and accelerated growth rate that develops glucose intolerance, obesity, and insulin resistance with aging. In agreement, human studies show that accelerated growth rate during infancy may lead to childhood obesity and increases risk of diabetes in adulthood (4). Moreover, neonatal overfeeding in rats also leads to rapid weight gain and development of obesity and diabetes in the adult (6, 7, 16). Hence, both human and animal data clearly suggest that growth trajectories during early life may influence adult metabolism and might be a good predictor for later risk of chronic disease (4, 5). In accord, we had previously described that postnatal slow growth rate, due to reduced caloric intake, results into the opposite phenotype: adult

mice that exhibited slow neonatal growth rate were lean, insulin sensitive, hypoinsulinemic, and have some improvement on glucose tolerance compared with control mice (5, 17, 18). In conclusion, these data suggest that control of neonatal feeding and, hence, neonatal growth are critical mediators of adult health and disease.

Recent data suggest that neonatal and/or childhood overfeeding may additionally have consequences for subsequent generations: augmented food availability during the prepubertal growth period in men predisposes to diabetes and diabetes-related death in their grandsons (10). In agreement, here we demonstrate that neonatal overfeeding predisposes to glucose intolerance and fasting hyperglycemia, not only in the exposed individuals but also their offspring and their grand-offspring. Strikingly, we show that these neonatally-induced diabetes-related phenotypes can be inherited through the male lineage. While it is well known that the mother's metabolism strongly influences her offspring's metabolism (maternal effects) (8, 19), literature describing paternal effects is scant, with only a few examples in animal models (20–22) and humans (10). These data, including ours, are of clinical relevance, because they suggest that paternal history may have a more profound influence on offspring metabolism than previously thought.

Mechanistically, inheritance of environmentally-induced phenotypes through the paternal lineage is likely due to epigenetic modifications residing in cells from the germ line (23, 24). In this regard, it has been shown that nutrition and other environmental cues early in life may modify the epigenome, including DNA methylation and histone modifications, in both somatic and germ cells (16, 23, 25–27). For example, and relevant to our model, it has been recently described that neonatal overfeeding may change patterns of DNA methylation in the proximal promoter of the anorexigenic hypothalamic gene POMC (16). This results in lack of POMC up-regulation in response to leptin and insulin, which might explain, in part, obesity-associated hyperphagia in this rat model.

Thus, taking together all previous observations, here we propose that in our model early overfeeding might cause permanent alterations in both somatic and germ cells, in part through epigenetic modifications. Adaptations in somatic cells may explain diabetic phenotypes in F0 mice, whereas modifications in germ cells might provide the basis for the transgenerational effects. Alternatively, it might be also possible that paternal obesity *per se* (or obesity-associated metabolism) induces, indirectly, modifications in sperm that are, in turn, transmitted to the following generation. As a matter of fact, ON-F0 male breeders are actually heavier than controls



**FIG. 2.** Physiological characterization of ON-F1 and ON-F2 male mice. **A**, Experimental design, including the breeding scheme for first (F1) and second-generation (F2) offspring. Circles designate females and squares designate males as indicated in the *Materials and Methods* section. Metabolic analysis was performed in males only. **B**, Early postnatal growth from birth to age 4 weeks.  $15 \pm 6$  mice per group. **C**, Body weight from birth until age 6 months.  $n \geq 20$  mice per group. **D**, Glucose tolerance test (2 g glucose/kg body weight) was performed in unrestrained 4-month-old male mice after an overnight fast.  $n \geq 14$  mice per group. **E**, HOMA-IR. Insulin sensitivity was assessed by the homeostatic model assessment as described in the *Materials and Methods* section.  $n \geq 14$  mice per group. **F**, Insulin released during the glucose tolerance test.  $n \geq 8$  mice per group. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*,  $P < 0.05$  vs. Control (Student's *t* test). In panels C and D, statistical analysis between groups was evaluated by ANOVA and results included in the graphs.  $P < 0.05$  was considered significant.

(Supplemental Fig. 1). While we cannot distinguish between these two potential options, it will be interesting to design an experiment where neonatal overnutrition does not result in adult obesity and ask whether lean ON-F0 mice also transmit metabolic phenotypes to the following generation.

Physiologically, impaired glucose tolerance in ON-F0 mice might be primarily attributed to peripheral insulin resistance rather than impaired  $\beta$ -cell function. Indeed, insulin release during an ip glucose tolerance is normal in ON-F0 mice, thus indicating that  $\beta$ -cells are still able to partially compensate for the developing insulin resistance. Likewise, impaired glucose tolerance in ON-F1 and ON-F2 mice might be accounted for primarily by peripheral insulin resistance. In agreement, fasting hyperglycemia in ON-F1 and ON-F2 male mice might suggest

uncontrolled hepatic gluconeogenesis, probably due to liver insulin resistance. This possibility will be further investigated.

Of note, despite these similar physiological trends across all three generations, inheritance of phenotypes is heterogeneous and does not equally involve all alterations described in ON-F0 mice: Thus, ON-F1 male mice develop insulin resistance, hypertriglyceridemia, elevated fasting glucose, impaired glucose tolerance, and a paradoxical reduction of fat mass, as assessed by epididymal fat content. On the other hand, ON-F2 mice have a milder phenotype than ON-F1 mice, characterized by moderate fasting hyperglycemia and impaired glucose tolerance only. Thus, we report that metabolic dysregulation is strongly reduced in second-generation offspring. Transgenerational weakening of phenotypes has



been previously reported in other animal models (22, 28, 29). As we have already discussed, progressive weakening of phenotypes indicates that these effects are likely mediated by epigenetic modifications rather than by changes in DNA sequence, that stay stable across generations (8).

## Conclusion

Here we show, for the first time, that male offspring and grand-offspring from neonatally over nourished male mice develop glucose intolerance by age 4–6 months. Transgenerational inheritance of metabolic dysfunction through the paternal lineage suggests that phenotypes are transmitted through the gametes, likely due to nutritionally-induced epigenetic modifications. Importantly, metabolic phenotypes fade away as generations fall apart from the original environmental cue, thus reinforcing the idea that transgenerational phenotypic progression occurs through nongenomic mechanisms. In sum, nutritional challenges occurring during sensitive periods of development, such as the early neonatal period, may have adverse metabolic consequences well beyond the lifespan of affected individuals and manifest in subsequent generations.

## Acknowledgments

We thank Dr. Elvira Isganaitis, Dr. Mary-Elizabeth Patti, and Dr. Torsten Ploech for helpful comments on the manuscript.

Address all correspondence and requests for reprints to: Josep C. Jimenez-Chillaron or Ruben Diaz, Fundacio Sant Joan de Deu, c/ Santa Rosa 39-57, 4<sup>a</sup> Planta, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain, 08950. E-mail: jjimenezc@fsjd.org or rdiaz@hsjdbcn.es.

This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovacion (BFU2008-03759/BFI, Spain) and Marie Curie Reintegration Grant (EU, FP6, MIRG-CT-2007-046542) (to J.C.J.-C.), and Fundacion2000 (PCP00026) (to R.D.). T.P. is recipient of a fellowship from Ministerio de Ciencia e Innovacion, Spain (BES-2009-012961).

Disclosure Summary: The authors have nothing to declare.

## References

- McGill Jr HC 1998 Nutrition in early life and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 9:23–27
- Leunissen RW, Kerkhof GF, Stijnen T, Hokken-Koelega A 2009 Timing and tempo of first-year rapid growth in relation to cardiovascular and metabolic risk profile in early adulthood. *JAMA* 301:2234–2242
- Durmuş B, Mook-Kanamori DO, Holzhauser S, Hofman A, van der Beek EM, Boehm G, Steegers EA, Jaddoe VW 2010 Growth in foetal life and infancy is associated with abdominal adiposity at the age of 2 years: the generation R study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 72:633–640
- Lucas A 2010 Growth and later health: a general perspective. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 65:1–11
- Jimenez-Chillaron JC, Patti ME 2007 To catch up or not to catch up: is this the question? Lessons from animal models. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14:23–29
- Plagemann A, Heidrich I, Götz F, Rohde W, Dörner G 1992 Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Exp Clin Endocrinol* 99:154–158
- Boullu-Ciocca S, Doutour A, Guillaume V, Achard V, Oliver C, Grino M 2005 Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes* 54:197–203
- Gallou-Kabani C, Junien C 2005 Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic. *Diabetes* 54:1899–1906
- Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S 2001 Longevity determined by paternal ancestors' nutrition during their slow growth period. *Acta Biotheor* 49:53–59
- Kaati G, Bygren LO, Edvinsson S 2002 Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur J Hum Genet* 10:682–688
- Pembrey ME, Golding J, ALSPAC Study Team 2006 Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet* 14:159–166
- Kaati G, Bygren LO, Pembrey M, Sjöström M 2007 Transgenerational response to nutrition, early life circumstances and longevity. *Eur J Hum Genet* 15:784–790
- Sampson DA, Jansen GR 1985 The effect of dietary protein quality and feeding level on milk secretion and mammary protein synthesis in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 4:274–283
- Herbach N, Rathkolb B, Kemter E, Pichl L, Klafoten M, de Angelis MH, Halban PA, Wolf E, Aigner B, Wanke R 2007 Dominant-negative effects of a novel mutated Ins2 allele causes early-onset diabetes and severe beta-cell loss in Munich Ins2C95S mutant mice. *Diabetes* 56:1268–1276
- Wallace TM, Levy JC, Matthews DR 2004 Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 27:1487–1495
- Plagemann A, Harder T, Brunn M, Harder A, Roepke K, Wittrock-Staar M, Ziska T, Schellong K, Rodekamp E, Melchior K, Dudenhausen JW 2009 Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol* 587:4963–4976
- Jimenez-Chillaron JC, Hernandez-Valencia M, Lightner A, Faucette RR, Reamer C, Przybyla R, Ruest S, Barry K, Otis JP, Patti ME 2006 Reductions in caloric intake and early postnatal growth prevent glucose intolerance and obesity associated with low birthweight. *Diabetologia* 49:1974–1984
- Isganaitis E, Jimenez-Chillaron J, Woo M, Chow A, DeCoste J, Vokes M, Liu M, Kasif S, Zavacki AM, Leshan RL, Myers MG, Patti ME 2009 Accelerated postnatal growth increases lipogenic gene expression and adipocyte size in low-birth weight mice. *Diabetes* 58:1192–1200
- Aerts L, Van Assche FA 2006 Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol* 38:894–903
- Nätt D, Lindqvist N, Stranneheim H, Lundeberg J, Torjesen PA, Jensen P 2009 Inheritance of acquired behaviour adaptations and brain gene expression in chickens. *PLoS One* 28; 4:e6405
- Sharma A, Singh P 2009 Detection of transgenerational spermatogenic inheritance of adult male acquired CNS gene expression characteristics using a Drosophila systems model. *PLoS One* 2; 4:e5763
- Jimenez-Chillaron JC, Isganaitis E, Charalambous M, Gesta S, Pentinat-Pelegrin T, Faucette RR, Otis JP, Chow A, Diaz R, Ferguson-

- Smith A, Patti ME 2009 Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice. *Diabetes* 58:460–468
23. Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS 2007 Non-genomic transgenerational inheritance of disease risk. *Bioessays* 29:145–154
24. Youngson NA, Whitelaw E 2008 Transgenerational epigenetic effects. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9:233–257
25. Jirtle RL, Skinner MK 2007 Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 8:253–262
26. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK 2005 Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308:1466–1469
27. Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA 2008 Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J Clin Invest* 118:2316–2324
28. Benyshek DC, Johnston CS, Martin JF 2006 Glucose metabolism is altered in the adequately-nourished grand-offspring (F3 generation) of rats malnourished during gestation and perinatal life. *Diabetologia* 49:1117–1119
29. Zambrano E, Martínez-Samayoa PM, Bautista CJ, Deás M, Guillén L, Rodríguez-González GL, Guzmán C, Larrea F, Nathanielsz PW 2005 Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 566:225–236



**Join The Endocrine Society** and network with endocrine thought leaders from around the world.

[www.endo-society.org/join](http://www.endo-society.org/join)





## Review

## The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health

Josep C. Jiménez-Chillarón<sup>a,\*</sup>, Rubén Díaz<sup>a,b</sup>, Débora Martínez<sup>a</sup>, Thais Pentinat<sup>a</sup>, Marta Ramón-Krauel<sup>b</sup>, Sílvia Ribó<sup>a</sup>, Torsten Plösch<sup>c,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Fundació Sant Joan de Deu, Paediatric Hospital Sant Joan de Deu, Spain

<sup>b</sup> Hospital Sant Joan de Deu, Universitat de Barcelona, Endocrine Division, Spain

<sup>c</sup> Department of Pediatrics, University Medical Center Groningen, University of Groningen, The Netherlands

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 March 2012

Accepted 11 June 2012

Available online 5 July 2012

## Keywords:

Developmental origins of health and disease

Nutritional epigenomics

Metabolic syndrome

Dietary Transitions

Caloric restriction

## ABSTRACT

Nutrition plays a key role in many aspects of health and dietary imbalances are major determinants of chronic diseases including cardiovascular disease, obesity, diabetes and cancer. Adequate nutrition is particularly essential during critical periods in early life (both pre- and postnatal). In this regard, there is extensive epidemiologic and experimental data showing that early sub-optimal nutrition can have health consequences several decades later.

The hypothesis that epigenetic mechanisms may link such nutritional imbalances with altered disease risk has been gaining acceptance over recent years. Epigenetics can be defined as the study of heritable changes in gene expression that do not involve alterations in the DNA sequence. Epigenetic marks include DNA methylation, histone modifications and a variety of non-coding RNAs. Strikingly, they are plastic and respond to environmental signals, including diet. Here we will review how dietary factors modulate the establishment and maintenance of epigenetic marks, thereby influencing gene expression and, hence, disease risk and health.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

*"You may be an undigested bit of beef, a blot of mustard, a crumb of cheese, a fragment of underdone potato. There's more of gravy than of grave about you, whatever you are!"*

**A Christmas Carol, Charles Dickens**

2012 marks the celebration of the Bicentennial of Charles Dickens. It is a good time to review his great narratives. They are full of elaborated descriptions of children growing under some sort of nutritional deprivation (Oliver Twist, David Copperfield) or even famine (Tiny Tim). Here we will review our current knowledge about the relationship between early malnutrition, later disease risk and how epigenetic mechanisms may link them.

### 1. Introduction: the rise of the field of *Nutritional Epigenomics*

Diet constitutes one of the major environmental factors that exert a profound effect on many aspects of health and disease risk.

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 6009455; fax: +34 93 6009771.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [jjimenezc@fsjd.org](mailto:jjimenezc@fsjd.org) (J.C. Jiménez-Chillarón), [T.Plösch@umcg.nl](mailto:T.Plösch@umcg.nl) (T. Plösch).

URL: <http://www.epigenetic-programming.nl>

For example, in industrialized countries, excessive caloric intake is a major determinant of complex chronic diseases, such as obesity, type 2 diabetes, cardiovascular disease and even cancer. According to the World Health Organization these diseases account for more than half of the deaths worldwide and have a huge impact on national economies (World Health Organization, 2003). Conversely, in poor countries, malnutrition and undernutrition, especially during the perinatal period, increase not only neonatal mortality and perinatal morbidities but also the risk of chronic diseases during adulthood [1–3]. This association between perinatal nutrition and late-onset disease has been conceptualized into the *Developmental Origins of Health and Disease Hypothesis* (DOHaD, Box 1 ([16–26,28,29,32])). Finally, a paradigmatic scenario is illustrated by chronic caloric restriction (CR). It has been shown that moderate global caloric restriction is the most powerful way to increase lifespan in various model organisms from different taxa, such as yeasts, worms (*Caenorhabditis elegans*), insects (*Drosophila melanogaster*) or mammals (including mice, rats and monkeys) [4].

Here we will review the evidence that supports a role for dietary factors, including micro-nutrients, macro-nutrients, and non-nutrient dietary components, in mediating disease risk through epigenetic modifications. Special emphasis will be put on the role of dietary factors during early perinatal development in the context of DOHaD. We will focus primarily on the Metabolic Syndrome,

## Box 1.

**Developmental Origins of Health and Disease Hypothesis (DOHaD)**

By the early 1990s the epidemiologist David Barker first came with his observation that the fetal environment has life-long programming effects for the offspring. Barker and his colleagues used birth weight as a surrogate marker for poor intrauterine nutrition and could show correlations between birth weight and the mortality risks for cardiovascular disease, insulin resistance and hypertension [16–19]. These seminal observations were followed by many epidemiologic evidences demonstrating that prenatal and early postnatal environmental challenges influence the risk of developing various chronic diseases during adulthood, including cardiovascular disease, diabetes, obesity, cancer and even some behavioural disorders [20–22]. Among environmental factors that program adult metabolic disorders, poor intrauterine nutrition is the most extensively studied [22–24]. Inadequate prenatal nutrition usually results in intrauterine growth restriction and, ultimately, low birth weight [3]. In developed countries, low birth weight accounts for up to 7% from all lived births. These numbers strongly aggravate in developing countries where average low birth weight increases up to 15% and, in some Southern Asian countries, it may even rise up to 27% (UNICEF Portal, [www.childinfo.org](http://www.childinfo.org)). This constitutes a major global health problem, including developed countries, since the proportion of people at risk for adult chronic diseases is achieving alarming epidemic proportions [1,2].

These epidemiologic data has been further confirmed by numerous animal models, including ours [25–28]. These works clearly support causality between *a)* nutritional challenges during early development and *b)* elevated risk for adult metabolic syndrome [29]. Experimental and human studies led to propose the *Developmental Origins of Adult Health and Disease* hypothesis, (DOHaD) [30,31]. This hypothesis proposes that environmental *stimuli*, like nutrition, acting during fetal and/or neonatal development can produce permanent changes in cell/tissue structure and function, through permanently modifying expression of target genes [30–32].

Several explanations have been put forward to explain the correlation between events that, in human studies, were separated by several decades. It has been proposed, and it is currently widely accepted that *epigenetic changes* induced by early nutrition influence later health and disease (see box 2).

**The Dutch Hunger Winter (1944–1945)**

The Dutch famine of 1944 took place in the German-occupied part of the Netherlands. From September, 1944 to May, 1945, the Nazis began a blockade that cut off food supplies and fuel shipments to the population of the western part of the Netherlands, to punish the reluctance of the Dutch to aid the Nazi war effort. Daily caloric supply during this time was decreased to as few as 700 calories per day. People suffered from chronic hunger and the diseases produced by malnutrition. Some 4.5 millions were affected and about 18,000 people died because of the famine. Most vulnerable according to the death reports were elderly men and children.

The Dutch Hunger Winter provided science and clinical medicine with a well-characterized population suitable for the study of DOHaD in humans. Hence, the so called *Dutch Cohort* is a population of pregnant mothers and fetuses that experienced malnutrition during first, second, or third trimesters. The main characteristics that made this population so important are summarized as follows: first, the famine was

short in time (6 months), started and ended abruptly and therefore it is clearly circumscribed in time and place. Second, the population was ethnically homogeneous and without remarkable prior differences in dietary patterns. Likewise, food availability during rationing was largely unaffected by social class. Third, the official food rations were known, so that the number of calories available could be estimated by place and time of birth. Finally, and most importantly, long-term follow-up was possible, since the childhood and adult medical histories of the fetuses that survived could be traced through national population registers.

In sum, for all these reasons, the Dutch Cohort constitutes an “excellent” population for the study of developmental programming of adult disease. In accord, a huge number of critical reports have already been published and many more will certainly be published in the future. Also, the first reports describing an association between nutritional imbalances *in utero* and altered epigenetic marks during adulthood have been described in subjects from this cohort [102,103].

characterized by insulin resistance, obesity, hypertension, hypertriglyceridemia, hyperglycaemia and diabetes [5]. The potential role of nutrition in Epigenetics—Cancer is extensively reviewed elsewhere [6–9,135]. We will examine the role of nutrition on epigenetic modifications in mammals. Hence, the role of nutrition on other model organisms (plants, *C. elegans*, *Drosophila*, zebrafish) will not be discussed here.

Epigenetics can be pragmatically defined as the study of stable inheritance of gene expression that occurs without modifications in the DNA sequence [10]. Epigenetic mechanisms in mammals include DNA methylation, histone modifications and, more recently, a variety of non-coding RNAs (key epigenetic concepts are summarized in Box 2) [11]. In the context of this review, it is relevant to state that epigenetic factors may be modulated by environmental cues, including nutrition, and thus provide a mechanism by which genomes integrate environmental signals into permanent changes of gene expression that may ultimately lead to health and disease risk [10–14]. This recognition has ignited the rapid growth of a novel field: *Nutritional Epigenomics* [15].

## Box 2.

**Epigenetics:** Stable inheritance of gene expression that occurs without modifications in the DNA sequence. Epigenetic mechanisms include DNA methylation, histone modifications and, recently, a variety of non-coding RNAs.

**DNA methylation:** It is a covalent modification that consists on the addition of a methyl group at cytosines of the DNA template. In mammals, DNA methylation occurs primarily at CpG dinucleotides.

CpG islands are regions in the DNA with a disproportional high abundance of dinucleotides CpG. Typically CpG islands exist around promoter regions of the genes.

Very recently, other DNA modifications, like hydroxymethylation, have been identified. The impact of these modifications on programming of adult disease is currently unknown.

**Histones:** Histones are alkaline proteins found in eukaryotic cell nuclei that package the DNA into structural units called nucleosomes. They are the main protein components of chromatin, acting as spools around which DNA winds, and play a role in gene regulation.

**Histone modifications:** Covalent modifications of histone residues that can alter chromatin states and, thus, gene regulation. Histone modifications include a series of complex post-translational modifications including methylation (mono-, di-, and tri-methylation), acetylation, SUMOylation, biotinylation, phosphorylation, ubiquitination and ADP-ribosylation.

**Histone code:** The *histone code hypothesis* suggests that specific histone modifications (or combination of modifications) may confer unique biological functions to regions of the genome where they associate. Given the fact that there exist 4 different histones and multiple types of modifications across the residues of the proteins, the combination of modifications is extremely high. This would result in a complex, *locus*-specific regulation of gene transcription.

**Non-coding RNAs (ncRNA):** They are functional RNAs that are not translated into proteins. Non-coding RNAs include transfer RNA (tRNA) ribosomal RNA (rRNA) and small nucleolar RNA (snoRNA). Recently, a series of new RNAs with regulatory activity have been added to the list: siRNA (small interfering RNA) miRNA (microRNA) and piRNA (piwi RNA).

**Genome and Epigenome:** The genome is the totality of the genetic information of a cell/organism that is contained in the DNA sequence.

The epigenome consists on all chemical modifications of DNA and histones of a cell/organism that contribute to regulate gene expression independently of DNA sequence.

One single genome may give rise to several epigenomes depending on environmental conditions, tissue specificity, developmental stages, etc. It is proposed that this relation (1 Genome/ n Epigenomes) constitutes the basis for fundamental biological issues such as pluripotency and cell differentiation, phenotypic variation, etc.

**Metastable epiallele:** It is an epiallele (an allele that can stably exist in more than one epigenetic state, resulting in different phenotypes) at which the epigenetic state can switch and establishment is a probabilistic event. Once established, the state is mitotically inherited.

*Sources: Molecular Biology of the Cell, Garland Science, Taylor and Francis Group, 4th Edition.*

*Epigenetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1<sup>st</sup> Edition.*

*Rakyan VK et al. Trends in Genetics. Volume 18, Issue 7, 348–351, 1 July 2002.*

This review is structured in order to address the following four key questions:

- 1. WHEN** do dietary factors influence the epigenome, thus leading to long-term changes in gene expression? It is remarkable to note that current evidence linking diet to epigenetic modifications can be narrowed down to two specific scenarios: First, during “critical windows” of early development (specially during fetal development and/or early neonatal growth) and, second, in adult individuals, during “Dietary Transitions” (such as high fat feeding, caloric restriction, etc.) occurring over a relatively long period of time (Fig. 1). Therefore, before extensively reviewing most relevant examples linking nutrition and epigenetic modifications, we will summarize the concepts of “critical windows” and “homeostasis vs. chronic dietary transitions” (Section 2).
- 2. WHAT** are the evidences linking diet and epigenetic modifications? Most relevant studies describing nutritional variation

and epigenetically-associated metabolic phenotypes will be summarized in Section 3 (Tables 1–3).

- 3. HOW** do dietary factors influence the epigenome? In other words, what are the mechanisms that link dietary factors and epigenetic modifications? Molecular mechanisms are reviewed in Section 4 (Figs. 2–4).
- 4. WHY** is nutrition regulating gene expression through epigenetic modifications, particularly during specific stages of development or during the course of Dietary Transitions? As yet, this is an open question that generates an intense debate. In this last section we will comment on the current thinking relating the biological meaning of nutrition during development and its impact on long-term regulation of gene expression.

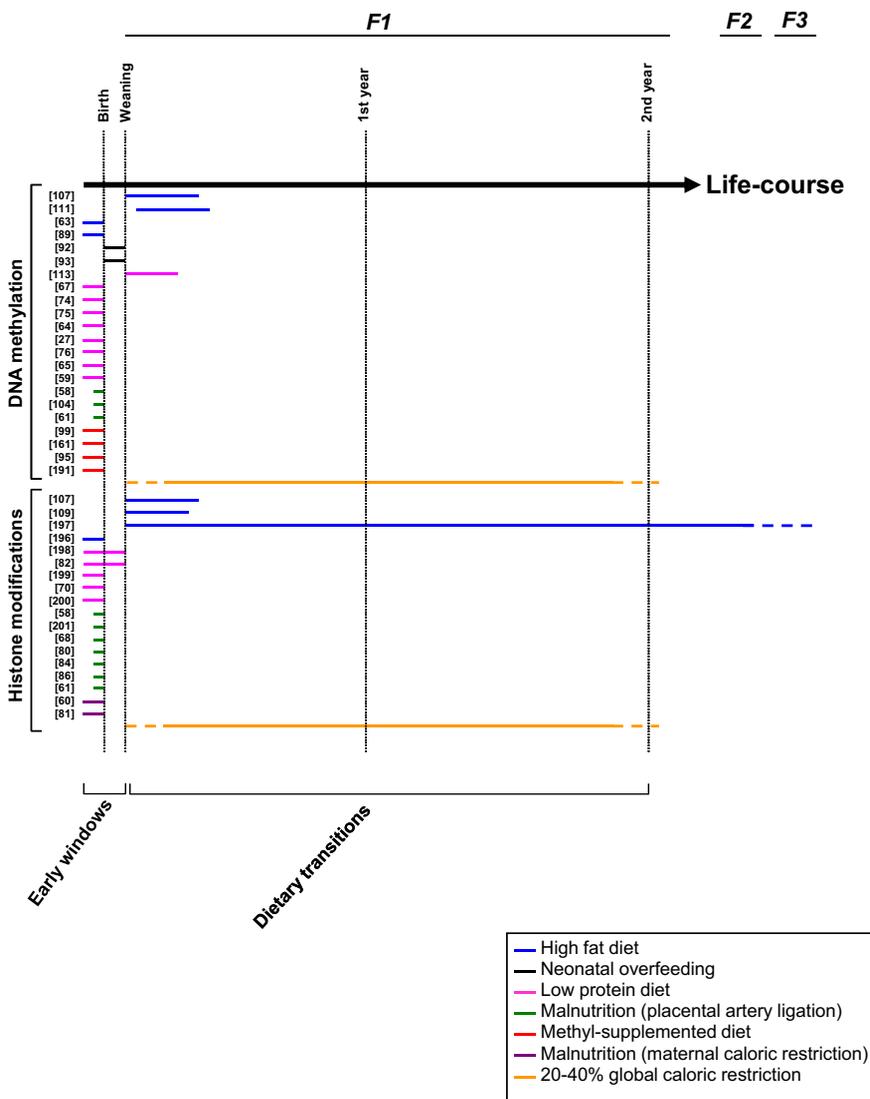
## 2. WHEN do dietary factors influence the epigenome?

Under what circumstances does nutrition induce epigenetic modifications? Epidemiologic and experimental evidences linking diet to epigenetic modifications can be narrowed down to two scenarios (Fig. 1): (1) First, during “critical windows” of development, including fetal and early neonatal growth. (2) Second, during “Dietary Transitions” occurring over a long period of time in adult individuals. Typical examples of these Dietary Transitions are chronic overfeeding, high fat feeding or chronic caloric restriction.

### 2.1. Critical windows of development

Developing organisms are under dynamic changes, and organ systems undergo rapid development characterized by cell proliferation/differentiation. Epigenetic mechanisms during early stages of development contribute to faithfully maintain undifferentiated stem-cells on one hand, and organogenesis on the other one [33,34]. Thus, early embryogenesis in mammals is the most critical period for the establishment of the epigenome. In particular, between fertilization and implantation, the embryo demethylates the genome widely [35–37]. Short after implantation, there is a wave of re-methylation that sets the epigenetic patterns for different cell types. Therefore, these periods constitute critical spatiotemporal windows of development during which the epigenetic marks are either partially erased or re-set. Failure to complete these programs in time might be irreversible and lead to permanent dysregulation of gene expression [15,38]. Importantly, this is a period especially vulnerable to environmental cues, such as nutrition, that can disrupt the correct establishment of epigenetic marks that, once established, remain highly stable. Arguably, this is the reason why nutritional challenges during early windows of development might have such long-term effects in the context of DOHaD.

A striking example of the *critical-window*-concept arises from the Dutch Famine (Box 1) [39–41]. At the end of the Second World War, individuals from the Western Netherlands were exposed to acute undernutrition for a defined period of 4 months. The disease risk of the offspring’s of women who were pregnant during the Dutch Famine was different depending on if it was during the beginning, the middle or close to the end of gestation at the time of the famine. Individuals affected early in pregnancy have cardiovascular complications, including a pro-atherogenic lipid profile, and reduced cognitive functions [41–44]. Mid-gestational maternal undernutrition was associated with impaired kidney and lung function [41,45,46]. Lastly, individuals suffering starvation at the end of gestation had striking differences with regards to glucose tolerance at adult age, although this is a feature which is present in all groups at low levels [41,47]. Whether these differences are mediated, in part, by epigenetic



**Fig. 1.** Summary of studies, from Tables 1–3, showing length and time of dietary intervention over the life course of the mouse/rat, as model organism. Each horizontal colored line corresponds to an individual study, and length-time of the intervention is projected against the black arrow representing the life-course (2 years average) of a laboratory rodent. The studies can be grouped into two distinctive clusters: First, interventions during early windows of development, including prenatal and early neonatal stages of development until weaning. Second, interventions in adult individuals consisting on Dietary Transitions over a long period of time (from 9 weeks to over the lifespan of the individual).

modifications remains unknown. But it is likely that (a) the time, (b) the intensity and (c) duration of an environmental factor may induce different epigenetic alterations in a tissue-dependent manner. At this point we lack a systematic survey describing the epigenomic modifications (and phenotypic effects) mediated by different dietary factors during specific well-controlled periods of development.

### 2.2. Dietary Transitions

Epigenetic variations are not only restricted to early windows of development but also may occur throughout an individual life-course (Figs. 1 and 2). Such epigenetic variations accumulate over a long period of time and may ultimately influence phenotypic outcomes (health and disease risk). This is clearly exemplified

**Table 1**  
Summary of relevant studies showing effects of dietary conditions on DNA methylation in humans and model organisms.

Dietary condition	Species	Period of dietary input	Tissue(s)	Methylation	Epigenetically regulated gene(s)	Observed phenotype	Reference
High fat diet	Mouse	Adult dietary transition	Brain (various regions)	↑ ↑ ↑	Oprm1 Th Dat	Dopaminergic (Th and Dat) and the opioid systems (Oprm1), which participate in the central regulation of food intake and the development of obesity, were altered.	[107,108]
	Rat	Adult dietary transition	Islet cells	↓	Il13ra3	Progressive beta-cell dysfunction in islet cells from paternally high fat fed rats.	[111]
	Mouse	<i>In utero</i>	Brain	↓ ↓ ↓	Dat Mor Penk	Altered gene expression of dopamine and opioid-related genes may change behavioral preference for palatable foods and increase risk of obesity and obesity-related diseases.	[63]
	Rat	<i>In utero</i>	Liver	↓	Cdkn1a	Offspring from high fat fed dams developed hepatic steatosis and characteristics of non-alcoholic liver disease.	[89]
Neonatal overfeeding/ overgrowth	Rat	Neonatal	Hypothalamus	↑	↓ Pomc expr/leptin ratio ↓ Pomc expr/Insulin receptor ratio	Early overfeeding resulted in a metabolic syndrome phenotype (obesity, hyperleptinemia, hyperinsulinemia, insulin resistance and diabetes).	[92]
	Rat	Neonatal	Hypothalamus	↑		Same model than in [92]. Reduced insulin receptor expression leads to hypothalamic insulin resistance and predisposition to altered feeding behavior characteristic of this model.	[93]
	Human	Neonatal	Peripheral blood	↓	TACSTD2	Rapid postnatal growth is associated with increased childhood adiposity (9–15 years).	[189]
Low protein diet	Mouse	Adult dietary transition—transgenerational effect	Liver	↑	PPARα	Increased hepatic cholesterol/lipid biosynthesis, increasing risk of fatty liver and steatosis.	[113]
	Rat	<i>In utero</i>	Liver	Global DNA hypermethylation	None (global analysis)	Low maternal protein availability during gestation results in glucose intolerance and hypertension in the adult.	[67]
	Rat	<i>In utero</i>	Adrenal gland	↓	AT(1b)	Maternal low-protein diet resulted in the development of hypertension in the offspring.	[74,75]
	Rat	<i>In utero</i>	Hypothalamus	↑	Pomc	Maternal low-protein nutrition can affect brain development and expression of orexigenic/anorexigenic genes.	[64]
	Mouse	<i>In utero</i>	Liver	↑	Lxra	Protein restriction during pregnancy reduced <i>Lxra</i> -dependent hepatic cholesterol biosynthesis.	[27]
	Mouse	<i>In utero</i>	Adipose tissue	↓	Lep	Offspring from mothers fed a low-protein diet showed increased food intake and increased adiposity.	[76]
	Rat	<i>In utero</i>	Islet cell	↑	Hnf4a	Reduced expression of <i>Hnf4a</i> contributes to beta-cell dysfunction and development of type 2 diabetes.	[65]
	Pig	<i>In utero</i>	Liver	↓	Somatic cytochrome <i>c</i> (CYCS),	Increased cytochrome <i>c</i> gene expression, may be involved in changed mitochondrial function	[206]
	Rat	<i>In utero</i> + neonatal	Liver	↓ ↓	PPARα GR	Altered expression of PPARα and the glucocorticoid receptor might contribute to altered carbohydrate/lipid homeostasis and hypertension, respectively.	[59,70,71]
Intrauterine malnutrition; placental artery ligation	Rat	<i>In utero</i>	Liver	Global DNA hypomethylation in fetal livers	None (global analysis)	Utero-placental insufficiency through bilateral artery ligation caused insulin resistance and diabetes in the adult.	[58]
	Rat	<i>In utero</i>	Islet cell	↑	Pdx1	Adult-onset type 2 diabetes. Diabetes was associated with progressive silencing of the transcription factor <i>Pdx1</i> .	[61]
	Rat	<i>In utero</i>	Islet cell	Genome-wide HELP assay: 1400 loci differentially methylated (both hyper- and hypo-methylated). ↓	Validated loci are: Fgfr1	Same model as in [61]. Type 2 diabetes due, in part, to beta-cell dysfunction. Genome-wide DNA methylation analysis showed that alterations occurred near genes regulating processes such as vascularization, beta-cell proliferation, insulin secretion, and cell death.	[66]



Table 1 (continued)

Dietary condition	Species	Period of dietary input	Tissue(s)	Methylation	Epigenetically regulated gene(s)	Observed phenotype	Reference
Intrauterine growth restriction/low birth weight	Human	<i>In utero</i>	Peripheral blood	↑	Vgf	Individuals periconceptionally exposed to acute famine during the Dutch Hunger Winter show differential methylation profile in a number of <i>loci</i> implicated in growth and metabolism. These changes might contribute to late-onset cardiovascular disease and diabetes.	[102,103]
				↑	Gch1		
				↑	Pcsk5		
				↑	IL10		
				↑	LEP		
				↑	ABCA1		
	Human	<i>In utero</i>	Cord blood (CD34+ hematopoietic stem cells)	↓	GNASAS	Validated <i>loci</i> : <i>HNF4a</i> is a transcription factor that has been implicated in a form of type 2 diabetes.	[104]
				↓	MEG3		
				↓	IGF2		
	Human	<i>In utero</i>	Peripheral blood	↑	INSIGF	DNA methylation at putative metastable epialleles was elevated in individuals conceived during the rainy season, which is the famine period of the year, in the rural Gambia. Phenotypes is as yet undetermined.	[101]
				↑	BOLA3		
				↑	FLJ20433		
Human	<i>In utero</i>	Umbilical cord blood	↑	PAX8	Increased childhood obesity and whole-body bone area/bone mineral density by age 9 years.	[105,106]	
			↑	SLITRK1			
			↑	ZFYVE28			

Oprm1: opioid receptor 1; Th: tyrosine hydroxylase; Dat: dopamine transporter; Il13ra2: interleukin 13 receptor, alpha 2; Dat: dopamine reuptake transporter; Mor:  $\mu$ -opioid receptor; Penk: preproenkephalin; Cdkn1a: cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1); Pomc: pro-opiomelanocortin-alpha; IR: insulin receptor; TACSTD2: tumor-associated calcium signal transducer; Ppara: peroxisome proliferator activated receptor alpha; AT1b: angiotensin receptor 1b; Lxra: liver X receptor-alpha; Lep: leptin; Hnf4a: hepatic nuclear factor 4, alpha; Cyts: somatic cytochrome c; Ppara: peroxisome proliferator activated receptor alpha; GR: glucocorticoid receptor; Fgfr1: fibroblast growth factor receptor 1; Vgf: nerve growth factor inducible; Gch1: GTP cyclohydrolase 1; Pcsk5: proprotein convertase subtilisin/kexin type 5; Pdx1: pancreatic and duodenal homeobox 1; IL10: interleukin 10; ABCA1: ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1; GNASAS: GNAS antisense RNA 1 (non-protein coding); MEG3: maternally expressed 3 (non-protein coding); IGF2: insulin-like growth factor 2; INSIGF: INS-IGF2 readthrough; BOLA3: boIA homolog 3 (*E. coli*); FLJ20433: exonuclease 3'-5' domain containing 3; PAX8: paired box 8; SLITRK1: SLIT and NTRK-like family, member 1; ZFYVE28: zinc finger, FYVE domain containing 28. RXRa: retinoid X receptor, alpha; eNOS: endothelial nitric oxide synthase.

in studies with isogenic laboratory animals or monozygotic twins: In both conditions individuals are genetically identical. Yet, during aging one individual from the twin pair, or some individuals in a colony, shows phenotypic differences attributable to differential accumulation of epigenetic variation [48–51]. Aging-dependent accumulation of epigenetic variation depends on genetic, stochastic and, importantly, environmental factors [52]. The phenotypic influence of environmental factors on adults is less pronounced than in developing individuals because epigenomes are now largely established (as opposed to rapid epigenomic remodeling occurring during embryogenesis). Nevertheless, nutrition can still have long lasting effects, especially during long-term “Dietary Transitions” (Fig. 1).

The concept of Dietary Transitions, as it is used here, is better understood by contraposition to homeostasis. Homeostasis can be defined as the capacity of a system, generally a living organism, in maintaining a stable, constant set of parameters, such as nutrient levels, pH, temperature, etc. Homeostatic processes occur over a (1) **short period of time**, ranging from seconds to days, and imply (many times) (2) **dramatic (3) reversible changes in gene expression**. A classic example is the homeostatic adaptation to feeding and fasting in mammals. During fasting glucagon is produced and activates the whole transcriptional program that regulates gluconeogenesis. This is characterized, in part, by a striking up-regulation of the expression of key gluconeogenic genes such as phosphoenolpyruvate carboxykinase (*Pepck*) or glucose-6-phosphatase (*G6pc*). During feeding conditions, however, glucagon production is reduced and insulin represses gluconeogenesis, in part by inhibiting *PEPCK* and *G6Pase* at the transcriptional level.

In contrast to homeostasis, during Dietary Transitions organisms are exposed over a (1) **prolonged period of time** (ranging from weeks–months in rodents to years in humans) to a diet characterized by an excess or a deficiency in a particular set of nutritional factors. Examples include protein deficiency, hypercaloric diets, or caloric restriction, among others. This type of transitions may cause (2) **subtle (3) long-lasting (or permanent) changes in gene expression**. Some of these changes may be mediated by epigenetic mechanisms. Epigenetically-associated changes in gene expression, although potentially reversible, tend to be stable and contribute to the age-dependent increase of disease risk [53–55].

In sum, dietary exposures occurring over specific periods of life can have permanent consequences for health and disease risk. The question now is to characterize the molecular mechanisms through which these types of dietary exposures may exert such long-term effects (Section 4).

### 3. WHAT are the evidences linking diet and epigenetic modifications?

Here we will review the most relevant studies linking variation in nutrition with epigenetic modifications. It is important to note that the most abundant and compelling evidence is based on studies relating early nutritional imbalances with later onset of chronic diseases in the context of DOHaD (Fig. 2). Whether this reflects a true biological scenario, meaning that early development is more sensitive to environmental cues than later stages of life, or an artifact, due to biased experimental designs aimed to search for epigenetic variation in early stages vs. later stages of life history, is not clearly established. Moreover, as these studies are generally

**Table 2**

Summary of relevant studies showing effects of dietary conditions on histone modifications in humans and model organisms.

Dietary condition	Species	Period of dietary input	Tissue	Histone modification(s)	Epigenetically regulated gene(s)	Observed (or associated) phenotype (health and disease)	Reference
High fat diet (HFD)	Japanese macaques	<i>In utero</i>	Liver	↑Acetylation (H3K14)	Correlations between hepatic H3 and gene expression are absent or subtle ( $P > 0.05$ ).	Maternal high fat feeding increased fetal liver triglyceride accumulation. Likewise, hepatic histology correlated with non-alcoholic liver disease.	[91]
	Mouse	Adult dietary transition: from weaning to age >18 weeks	Brain	↓Acetylation (H3K9) ↑Methylation (H3K9)	Oprm1	Chronic high fat diet resulted in altered food behavior (preference for sucrose diets) and obesity in the offspring.	[107]
	Rat	Adult dietary transition: HF diet containing 45% Kcal from fat for 13 weeks	Liver	↑Acetylation (H3, H4) ↓Methylation (H3K27 and H3K27Me3) ↑Methylation (H3K4Me2).	p16INK4a and p21Cip1	Obesity prone rats fed a high fat diet showed activation of the cellular senescence pathway (p16INK4a and p21Cip1), which was associated with hepatic steatosis.	[109]
	Rat	<i>In utero</i>	Liver	↑Acetylation (H4) ↓Methylation (H3K9Me3 and H3K27Me3)	Pck1	Foetal offspring of HF-fed dams had significantly higher mRNA contents of gluconeogenic genes, which can contribute to late onset glucose intolerance and diabetes.	[196]
	Mouse	Three consecutive generations (F0, F1, and F2)	Liver	↓Methylation (H3K9Me2)	LXRa and ERO1-a	The male offspring of the F2 generation (derived from both grand-maternal and maternal obesity) were highly susceptible to developing obesity and hepatic steatosis.	[110]
Maternal Low protein diet (LP)	Pig	Gestation and lactation	Skeletal muscle	↑Acetylation (H3) ↑Methylation (H3K27Me3) ↓Methylation (H3K9Me)	Mstn	Maternal low protein diet influences myostatin gene expression at weaning and finishing stages influencing muscle mass, and potentially insulin sensitivity, in the offspring.	[197]
	Rat	Pregnancy and lactation	Liver	↓Acetylation (H3) ↑Methylation (H3K9Me3)	Cyp7a1	Body weight and liver growth were impaired in the male offspring. Likewise, circulating and hepatic cholesterol levels were increased in the adult offspring.	[82]
	Rat	<i>In utero</i>	Skeletal muscle	↑Acetylation (H3, H4)	C/EBPb	Low protein availability during gestation altered amino acid and energy homeostasis in skeletal muscle and fat deposition during muscle development in the offspring.	[198]
	Rat	<i>In utero</i>	Liver	↑Acetylation (H3, H4, and H3K9) ↓Methylation (H3K9Me3)	GR	Increased hepatic expression of the glucocorticoid receptor in the offspring contributed to glucose intolerance and increased hepatic glucose production.	[70]
	Rat	<i>In utero</i>	Liver	↑Acetylation (H4) ↑Methylation (H3K9Me3)	Asns; Atf3	Maternal low protein diet programmed the amino acid response pathway in the liver of the offspring. These alterations might potentially lead to liver dysfunction, including defective glucose homeostasis.	[199]
<i>In utero</i> undernutrition (utero-placental insufficiency, UPI)	Rat	<i>In utero</i>	Liver	↑Acetylation (H3)	Global H3 hyperacetylation in livers from P0 and P21 rat offspring.	Uteroplacental insufficiency (UPI) leads to increased risk of insulin resistance, hypertriglyceridemia, hyperglycemia and overt diabetes in the adult rat offspring.	[58]
	Rat	<i>In utero</i>	Liver	↑Acetylation (H3K9, H3K14 and H3K18)	PGC1a and CPT1a	Same model as in [58]; changes in PGC1a and CPT1a may contribute to hepatic metabolic dysfunction.	[200]
	Rat	<i>In utero</i>	Brain	↑Acetylation (H3K9Ac and H3K14Ac)	Global histone modifications (no specific loci are described)	UPI caused permanent changes chromatin structure of the hippocampus and the periventricular white matter of the offspring. These alterations might be associated to poor neurodevelopmental outcomes.	[68]
	Rat	<i>In utero</i>	Liver	↑Acetylation (H3K9Ac and H3K14Ac)	Dusp5	Same model as in [58]; <i>Dusp5</i> is a phosphatase that dephosphorylates Erk1 and 2, which in turn increases serine phosphorylation of IRS. IRS serine-phosphorylation contributes to hepatic insulin resistance.	[80]
	Rat	<i>In utero</i>	Hippocampus		GR	Same model as [58,68]; intrauterine growth restricted rats showed	[84]

Table 2 (continued)

Dietary condition	Species	Period of dietary input	Tissue	Histone modification(s)	Epigenetically regulated gene(s)	Observed (or associated) phenotype (health and disease)	Reference
				↑Acetylation (H3K9) ↑Methylation (H3K4Me3)		increased expression of hippocampal glucocorticoid receptor, which is an important regulator of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis.	
	Rat	<i>In utero</i>	Lung	↑, ↓Methylation in a developmental and gender-specific manner (H3K9Me3)	PPAR $\gamma$	Intrauterine growth restriction altered PPAR $\gamma$ expression, causing altered lung alveolization and postnatal lung disease in the male offspring.	[86]
	Rat	<i>In utero</i>	Islet cells	↓Acetylation (H3 and H4) ↓Methylation (H3K4) ↑Methylation (H3K9)	Pdx1	Intrauterine growth restriction resulted in adult-onset type 2 diabetes. Adult diabetes was associated with progressive silencing of the transcription factor Pdx1, which is critical for beta-cell function and development	[61,201]
<i>In utero</i> undernutrition (50% caloric restriction)	Rat	<i>In utero</i>	Skeletal muscle	↓Acetylation (H3K14) ↑Methylation (H3K9Me2)	Glut-4	50% caloric restriction during the last week of gestation represses skeletal muscle Glut4 expression in the adult rat offspring.	[60]
	Rat	<i>In utero</i>	Liver	↓Methylation (H3K4Me2) ↑Methylation (H3K4Me3)	Igf1	50% caloric restriction during gestation decreased H3K4Me2 at the hepatic IGF1 region of the newborn offspring. Intrauterine growth restricted rats that exhibited postnatal catch-up growth had decreased H3K4Me2 and increased H3K4Me3 in the IGF1 locus.	[81]

Oprm1:  $\mu$ -opioid receptor; p16INK4a: cyclin-dependent kinase inhibitor; p21Cip1: cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; Pck1: phosphoenolpyruvate carboxykinase; LXR $\alpha$ : liver X nuclear receptor alpha; ERO1-a: endoplasmic reticulum oxidation 1; Mstn: myostatin; Cyp7a1: cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase; C/EBP $\beta$ : CCAAT/enhancer-binding protein beta; GR: glucocorticoid receptor; Asns: asparagine synthetase; Atf3: activating transcription factor 3; PGC1 $\alpha$ : peroxisome proliferator activated receptor gamma, coactivator 1 alpha; CPT1a: carnitine palmitoyltransferase 1a; Dusp5: dual specificity phosphatase 5; Pparg: peroxisome proliferator-activated receptor gamma; Pdx1: pancreatic and duodenal homeobox 1; Glut4: Glucose transporter 4 insulin-responsive; Igf1: insulin-like growth factor 1.

conducted from the clinical perspective, with pathologies as readout, we currently do not know whether we miss the advantageous, evolutionary beneficial effects of epigenetic adaptations because of this biased view.

Recent articles have reviewed some aspects covered in this section [56,57]. Therefore, we have kept it short and summarized most experimental data in Tables 1–3.

### 3.1. Nutrition during early development: epigenetics and DOHaD

#### 3.1.1. Animal models

The association between dietary changes during specific windows of development and epigenomic modifications has been reported in several animal models (Tables 1–3) [27,58–68]. They constitute an excellent tool to understand how particular nutritional regimens or specific dietary factors may influence the epigenome. The most widely studied nutritional challenges include protein deficiency, global caloric restriction, high fat feeding and excessive neonatal food intake. A special chapter is constituted by the Agouti mouse model which, although mechanistically likely to be an exemption, serves as a visualization of the current ideas in the field.

**3.1.1.1. Protein malnutrition.** Protein restriction is frequently used as a model for maternal malnutrition. Often, diets of 18% casein (control) and 9% casein (restricted) are compared, but sometimes other percentages of protein are used or restricted diets are compared to chow. This should be kept in mind when comparing different studies. Feeding a low protein diet to pregnant rats resulted in global DNA hypermethylation in livers from the offspring [67]. This was among the first studies showing a link between nutritional imbalances during intrauterine development and epigenetic modifications. More recent studies have also confirmed that maternal low-protein feeding during gestation

may also result in locus-specific changes in DNA methylation (Fig. 2, Tables 1–3). More importantly, these changes remain stable until adulthood, thus providing a molecular basis for DOHaD. Reported genes (or loci) include the glucocorticoid receptor (GR), peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) and liver X receptor-alpha (Lxr $\alpha$ ) in liver [27,59,69–73]; the hepatocyte nuclear factor-4-alpha (Hnf4a) in islet cells [65]; the AT(1b) angiotensin receptor in adrenal gland [74,75]; the orexigenic/anorexigenic genes neuropeptide Y (Npy) and proopiomelanocortin C (Pomc) in hypothalamus [64]; and the leptin gene (Lep) in adipose tissue [76].

Importantly, in the previous examples, changes in DNA methylation correlate with altered gene expression. Therefore, such nutritionally-induced changes in DNA methylation may explain, at least in part, metabolic dysfunction in the adult. Hence, altered expression of GR, PPAR $\alpha$  and Lxr $\alpha$  may explain altered lipid metabolism and hepatic steatosis which in turn contributes to hepatic insulin resistance. Dysregulated expression of Hnf4a in islet cells may lead to beta-cell dysfunction and type 2 diabetes. Finally, Npy, Pomc and Lep regulate appetite in rodents. Therefore, aberrant expression of these genes may alter feeding behavior and explain the development of obesity and obesity-related diseases including insulin resistance and diabetes. In sum, there is now sufficient evidence to support that maternal protein malnutrition may induce permanent alterations in gene expression through epigenetic modifications. These alterations can contribute, in part, to the development of obesity, insulin resistance and type 2 diabetes in the adult.

**3.1.1.2. Global caloric restriction: placental artery ligation.** Global caloric restriction is another frequently used model for maternal malnutrition. Caloric restriction in animal models has been accomplished by either placental artery ligation or by global caloric restriction.

**Table 3**

Summary of relevant studies showing effects of dietary conditions on micro-RNA expression in humans and model organisms.

Dietary factor	Species, timing	Tissue(s)	Observed phenotype (miRNAs modulated)	Reference
Maternal high fat feeding	Mouse ( <i>in utero</i> )	Liver	Maternal high fat feeding prior to conception, during gestation and lactation changed the expression of 23 miRNAs (from 579 miRNAs present in a microarray) in livers from the adult offspring. Strikingly, methyl-CpG binding protein 2 was the common predicted target for several of the identified miRNAs (miR-709, -let7s, -122, -194 and -26a).	[177]
High fat feeding supplemented with linoleic acid	Mouse (adult)	White adipose tissue (WAT)	Expression of miR-103, miR-107 (lipid metabolisms) and miR-103, miR-107 (altered in obesity) changed in response to the treatment with conjugated linolenic acid, currently used to induce fat loss.	[179]
Biotin	Human ( <i>in vitro</i> )	Primary human cells	Physiological concentrations of biotin increased miR-539 abundance in a dose-dependent manner. miR-539 regulates holocarboxylase synthetase, which catalyzes the covalent binding of biotin to carboxylases and histones.	[202]
Polyphenols from yaupon holly leaves (quercetin and kaempferol 3-rutinoside)	Human ( <i>in vitro</i> ); Mouse	Human colon cells;	Flavonol-rich fractions extracted from yaupon holly leaves exert anti-inflammatory properties in both human and mouse cells: 1. Quercetin and kaempferol 3-rutinoside up-regulated miR-146a in human colon cancer cells, which is a negative regulator of the pro-inflammatory factor NF- $\kappa$ B. 2. Quercetin treatment in mouse macrophages down-regulated the pro-inflammatory miR-155.	[180,203,204]
Ethanol	Human; Mouse	Colon biopsies and caco-2 cells; fetal brain	Ethanol induced expression of miR-212, which causes gut leakiness, a key factor in human alcoholic liver disease; prenatal ethanol exposure changed expression of several miRNAs in fetal brain from mice (miR-10a, 10b, 9, 145, 30a, 152, 200a, 496, 296, 30e-5p, 362, 339, 29c, 154). miR-10 up-regulation mediated, in part, Hoxa1 down-regulation. Co incubation with folate reverted these effects.	[178,205]
Vitamin E	Rat (Dietary Transitions)	Liver	Vitamin E-deficient diet (6 months) caused a down-regulation of miR-122a and miR-125b, which contribute to regulate lipid metabolism and cancer-inflammation, respectively.	[181]
Starvation	Rat	Liver	Mild starvation (12 h) increased hepatic levels of miR-451, -122a, -29b. Insig1, which in turn inhibits Srebp1 production, is a predicted target of miR-29.	[183]

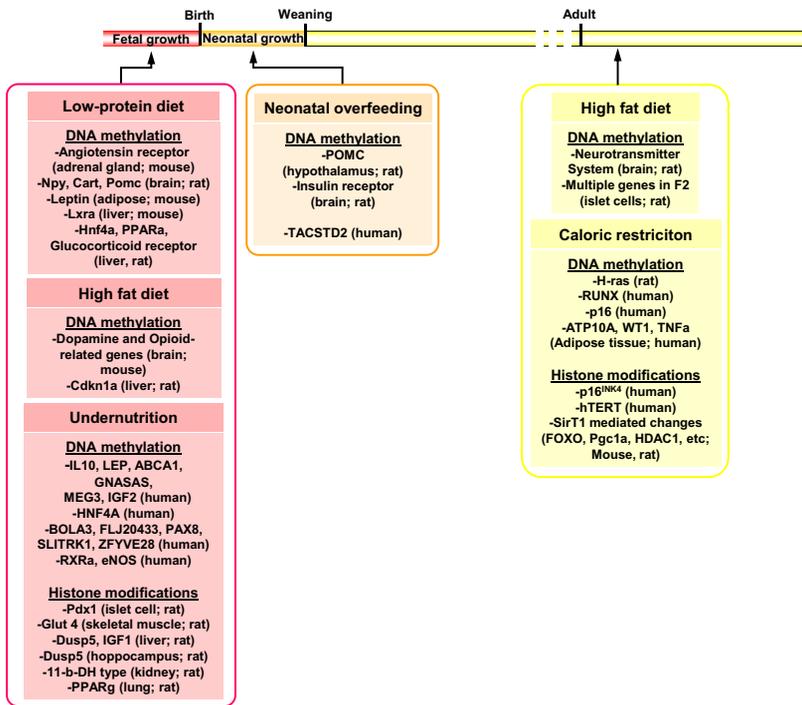
Bilateral placental artery ligation in rats has been widely used as a model of reduced nutrient and oxygen availability for the fetus [77,78]. This surgical procedure may both induce genome-wide DNA hypomethylation in fetal livers [58] and affect the histone code at specific *loci* in the offspring (Tables 1 and 2) [58,60–62,68]. For example, *in utero* undernutrition in rats reduces expression of the homeobox 1 transcription factor (*Pdx1*) in islet cells [61]; the dual specificity phosphatase 5 (*Dusp5*) [80] and cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (*Cyp7a1*) [82] in liver; dual specific phosphatase 5 (*Dusp5*) and the glucocorticoid receptor (GR) genes in hippocampus [83,84]; 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (*Hsd11b2*) in kidney [85]; and the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPAR $\gamma$* ) in lungs [86].

Similar to what we have described for the low protein diet, some of the previously described genes can contribute to different aspects of the metabolic syndrome. For example, *Pdx1* is a key transcription factor that regulates beta-cell differentiation. Hence, altered *Pdx1* expression may lead to beta-cell dysfunction and diabetes. On the other hand, *Dusp5* is a protein from MAPK-signaling pathway that can modulate insulin signaling. Thus, altered expression of *Dusp5* may induce tissue-specific insulin resistance that can ultimately contribute to whole body insulin resistance and diabetes. In sum, all these data clearly establish that in rodent models altered gestational nutrition may induce

chromatin remodeling at metabolically relevant *loci*, through changing histone marks.

To finish, we would like to notice a recent report from Nüsken and colleagues [79]. They have compared surgical uterine artery ligation with protein restriction in rats and found striking differences in the resulting phenotype [79]. Therefore, these acute and severe surgical interventions cannot be completely compared with any dietary regimen. It constitutes, though, a valuable model to understand developmental programming of the offspring in response to placental dysfunction/placental insufficiency which causes reduced nutrient and oxygen availability to the fetus.

**3.1.1.3. Global caloric restriction: nutritional deprivation.** In rats, 50% global caloric restriction during the last week of gestation resulted in reduced expression of the glucose transporter 4 (*Glut4*) in skeletal muscle from the offspring [60]. This alteration is mediated by specific changes of histone modifications (H3K14 deacetylation and increased H3K9 di-methylation). *Glut4* is a landmark protein that allows insulin-stimulated glucose uptake into peripheral tissues. Therefore, altered epigenetic regulation of *glut4* may contribute to the development of insulin resistance and diabetes in this rat model. In a similar rat model, 50% caloric restriction decreased the abundance of H3K4Me2 at the *IGF1 locus* of liver from the newborn offspring. This epigenetic modification alters

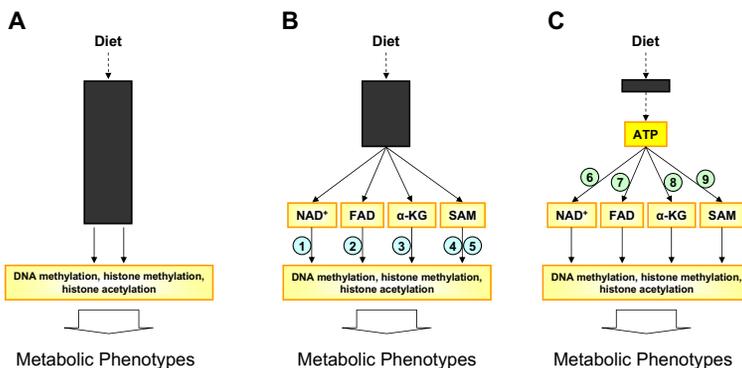


**Fig. 2.** Summary of the *loci* that show altered expression in association with an epigenetic modification. Results are grouped by dietary intervention, type of epigenetic event and window of intervention. Data included in this figure is derived from Tables 1–3, including humans and model organisms.

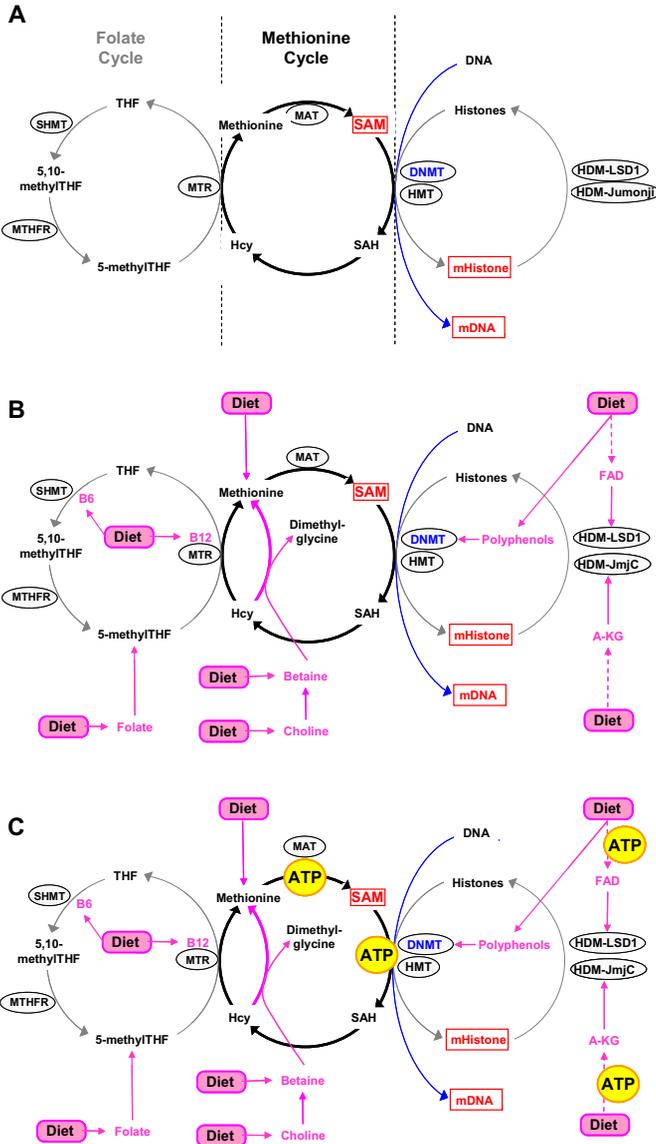
IGF1 expression and contributes to post-natal catch-up growth and subsequent risk of diabetes in the adult [62,81].

Moderate caloric restriction (30%) to pregnant non-human primates (Baboon) decreased methylation in fetal kidney during

early stages of gestation, whereas it increased DNA methylation by the end of gestation [87]. Likewise, DNA methylation was also increased in the frontal cortex during late gestational stages [87]. In a follow-up study, expression of the glucogenogenic enzyme



**Fig. 3.** Intracellular signals that translate nutrition into epigenetically-mediated metabolic phenotypes. **A.** diet, through not completely known mechanisms depicted by the black box, alters the epigenome. **B.** intracellular second-messengers synthesized in response to extracellular nutritional/energetic states and that are able to modulate the epigenome. **C.** the production of the second-messengers depends, directly or indirectly, from the synthesis of ATP (or the ATP/ADP ratio), which in turn is determined by the energetic state of the cell. ATP acts as a cofactor or it is necessary to fully activate the enzymes that catalyze the synthesis of NAD, FAD, α-KG and SAM. NAD (nicotinamide adenine dinucleotide), FAD (flavin adenine dinucleotide), α-KG (α-ketoglutarate), SAM (S-adenosyl methionine), ATP (adenosine triphosphate). 1: Class III histone deacetylase (sirtuins); 2: LSD1-containing domain histone demethylase; 3: JumonjiC-containing domain histone demethylase; 4: DNA methyl transferase; 5: histone methyl transferase; 6: nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase; 7: riboflavin kinase and FAD synthase; 8: α-ketoglutarate dehydrogenase; 9: S-adenosyl methionine transferase.



**Fig. 4.** The methionine cycle. **A.** connection between the methionine and folate cycles and their implication on DNA and histone methylation. **B.** interaction between the folate–methionine cycles and different dietary compounds that act as co-factors of the enzymes in the cycle. **C.** role of ATP as a common regulatory molecule in mediating the activity of key enzymes of the methionine cycle. Enzymes. SHMT: serine hydroxymethyl-transferase; MTHFR: methyltetrahydrofolate reductase; MTR: 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyl transferase; MAT: methionine adenosyl-transferase; DNMT: DNA methyl-transferase; HMT: histone methyl-transferase; HDM: histone demethylase. Metabolites. THF: tetrahydrofolate; SAM: S-adenosyl methionine; Hcy: homocysteine; SAH: S-adenosylhomocysteine; mDNA: methylated DNA; mHistone: methylated histone.

phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1) was increased in the fetal liver [88]. Strikingly, up-regulation of this gene occurred in association with the hypomethylation of the PCK1 promoter. These data support that moderate maternal nutrient reduction in non-

human primates causes organ-specific and gestational age-specific changes in DNA methylation. These changes may have long-term effects on fetal organ development [87] and be causative for metabolic dysfunction later in life [88].

**3.1.1.4. High fat diet.** *In utero* malnutrition (by either protein or global caloric restriction) is not the only experimental model by which maternal diet influences offspring epigenome during development. Hence, two recent reports showed that maternal high fat diet may alter DNA methylation and gene expression in the offspring. First, maternal high fat feeding during gestation altered methylation and gene expression of dopamine and opioid related genes in the brain from the offspring [63]. This change may influence behavioral preference for palatable foods, thereby increasing obesity and obesity-associated risk for metabolic syndrome. The second report demonstrated that offspring from mothers fed a high fat diet showed reduced methylation, and increased expression, of the cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (Cdkn1a) during neonatal liver development [89]. This alteration is responsible for changing hepatic proliferation and liver size, two aspects that are compatible with the development of a fatty liver phenotype [90]

Interestingly, maternal high fat feeding also altered the epigenome of the developing offspring of the Japanese macaque [91]. Consumption of a high fat diet during gestation increased fetal liver triglyceride content and led to non-alcoholic fatty liver disease. These phenotypic adaptations occurred in association with increased histone acetylation at H3K14 and H3K18. Next, by chromatin immunoprecipitation assays, the authors were able to identify *locus*-specific H3 candidate genes, such as Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2 (DNAJA2) or glutamic pyruvate transaminase 2 (GPT2). It is currently unknown whether these two genes may contribute to the accumulation of lipids and the development of fatty liver. It will be certainly interesting to further explore the potential implication of these genes on liver metabolism.

It is interesting to remark that the number of reports linking maternal high fat feeding with late onset disease is lower as compared to those linking caloric deprivation or protein restriction. We believe that this is just a methodological bias, because the initial paradigm described in the DOHAD was maternal caloric deprivation, starting already with Barker's focus on low birth weight. We expect that the number of studies focusing on maternal high fat feeding (or overnutrition, as a general idea) will grow over the next years. These studies will be extremely relevant because in Westernized societies the prevalence of maternal obesity (and maternal overnutrition) during gestation is increasing alarmingly.

To conclude, experimental data demonstrate that developmental programming of adult disease occurs at both sides of the spectrum, due to either caloric deprivation or nutritional excess. Although the specific mechanisms leading to adult disease in both situation will be likely different, the current evidences support that the epigenome might be a common molecular link between them.

**3.1.1.5. Neonatal overfeeding.** Nutritional effects on the epigenome are not limited to the intrauterine life, but extend to early neonatal period (Figs. 1 and 2). Thus, neonatal overfeeding in rats increased methylation of the promoter of the hypothalamic anorexigenic factor proopiomelanocortin, Pomc [92]. Permanent down-regulation of Pomc augments food intake, promotes obesity and may provide a mechanism to explain, in part, metabolic syndrome in this model [92]. Likewise, in a follow-up study, neonatal over-nutrition increased mean methylation of the insulin receptor promoter in the hypothalamus [93]. This alteration might additionally contribute to induce hypothalamic insulin resistance, thus contributing to the development of metabolic syndrome. To finish, neonatal overfeeding in the mouse also provoked permanent modifications in DNA methylation in the liver from adult individuals, as assessed by CpG island microarrays (Pentinat & Jimenez-Chillarón, unpublished results). 91 *loci* were differentially

methyated (49% hypermethylated, 51% hypomethylated). Cluster analysis demonstrated enrichment on developmentally-related genes (Wnt signaling pathway). Whether altered expression of Wnt proteins may mediate hepatic metabolic dysfunction remains to be determined.

To conclude this part, the data summarized above demonstrate that nutrition during early stages of development can induce permanent changes in gene expression of somatic cells through epigenetic modifications. The three important points that we would like to highlight are: (1) maternal malnutrition influences the epigenome of the fetus. (2) Some of the epigenetic marks established during early development remain stable until adulthood. (3) Perinatal malnutrition causes both global and *locus*-specific epigenetic modifications.

### 3.1.2. The agouti mouse model

The agouti viable yellow mouse (A<sup>vy</sup>) is a well established animal model for fetal programming studies and often used as a key example for the importance of epigenetic modifications [13,94–97]. The A<sup>vy</sup> allele resulted from the transposition of a murine retrotransposon upstream of the agouti gene. Although agouti is normally expressed only in hair follicles, its expression in other cells is regulated by methylation of this *locus*. Thus, isogenic offspring varies in agouti expression depending on developmental methyl group availability. The agouti signaling molecule both induces yellow pigmentation and antagonizes the satiety signaling cascade (at the melanocortin 4 receptor in the hypothalamus). This results in variably yellow fur and susceptibility to obesity by hyperphagia in correlation to the level of DNA methylation. This clearly shows the direct link between nutrition, epigenetics, and the resulting phenotype.

Therefore, besides regulatory pathways involved in regulation of metabolism (like GR, Pomc and LXR, summarized above and in Table 1), several other genomic *loci* have been identified as being especially vulnerable to epigenetic modifications. The agouti viable yellow mouse and the axin fused mouse are the most prominent examples [98–100], but recently the first human examples have been described [101]. These *loci* are suitable proof-of-principle candidates for measuring changes in DNA methylation following dietary challenges. However, it should be noted that it is currently not clear whether this phenomenon is universal or may be only limited to some exceptional *loci*.

### 3.1.3. Human evidences

As noted previously, the Dutch hunger winter was a period late during World War 2 when the Western part of the Netherlands was blocked from food transports for 4 months (Box 1). There is plenty of data on health outcome available from the abovementioned cohorts, linking fetal environment (particularly nutrition) and postnatal health [39–41]. Very recently, the links between famine and epigenetic markers in adults have been examined. In an elegant study, Heijmans and colleagues isolated DNA from white blood cells of individuals being peri-conceptually affected by famine [102]. They were among the first to demonstrate that the insulin-like growth factor 2 (IGF2) *locus* was less methylated in the famine group when compared to matched controls [102]. In a subsequent study they extended their analysis to more genes and examined sex-specific effects. DNA methylation in the famine-exposed group was increased for GNAS antisense RNA 1 (GNASAS), maternally expressed 3 (MEG3), interleukin 10 (IL10), ATP-binding cassette, sub-family A, member 1 (ABCA1) and leptin (LEP), while it was decreased for INS-IGF2 readthrough (INSIGF) [103]. Interestingly, they found that at least some of the epigenetic changes observed were sex specific. Until now, a detailed analysis of the putative physiological consequences of these findings is missing. However, it

is tempting to speculate that methylation changes in promoters of genes such as *LEP* (involved in satiety regulation) and *ABCA1* (involved in cholesterol transport and HDL formation) may link early nutrition to adult metabolic disease. To finish, it is remarkable that in both studies differences in DNA methylation were apparent more than 60 years after birth. It remains to be determined whether this type of alterations are already present at birth and maintained throughout life, or appeared secondarily in response to progressive metabolic dysfunction. Here, careful physiological studies have to follow in future.

Seminal studies from the Dutch cohort have been followed by a series of reports: A recent study by Waterland and colleagues extended our knowledge of nutritional influences during gestation on the epigenome to seasonal changes in nutrition [101]. The authors examined DNA methylation in individuals from rural Gambia. There, nutrition during the rainy season is largely different from nutrition during the dry season. The rainy season is characterized by reduced nutrient availability whereas the dry season is characterized by high nutrient availability. The authors reported that several putative metastable epialleles (Box 2) were differentially methylated (*BOLA3*, *FLJ20433*, *PAX8*, *SLITRK1*, *ZFYVE28*). These *loci* are stochastically methylated early during development and in mice reflect nutritional influences. Here, this phenomenon could be demonstrated for the first time in humans. Importantly, the authors also examined the methylation of other *loci* which have been previously been identified as targets of differential methylation (e.g., *LINE1*, *GNASAS*, *IL10*) and failed to demonstrate any nutritional influences. This may indicate that the duration and severity of the malnutrition has a pronounced effect on the establishment of epigenetic effects.

The key question is what the relevance of these changes in metastable epialleles for human disease is. On one hand, it is not known whether they can influence adult metabolism in any way. They might be useful, though, as biomarkers of early nutrition. They can be a good tool to determine whether an individual has developed under nutritional stress or not. This information might be extremely useful in order to enroll positive individuals into specific programs aimed to prevent late onset metabolic dysfunction. Nevertheless, the validity of these markers needs further evaluation including the presence in other independent human cohorts.

To finish, a set of very recent studies have determined patterns of DNA methylation in cells from cord blood [104–106]. For example, Einstein and colleagues analyzed global patterns of DNA methylation in hematopoietic stem cells (CD34+) from cord blood in intrauterine growth restricted and control babies by microarray analysis [104]. Bioinformatic analysis yielded that a small subset of 56 *loci* showed significant differences in methylation between groups. These genes were involved in processes critical for stem cell function (cell cycle, cellular maintenance). Strikingly, the diabetes-related gene hepatocyte nuclear factor 4, alpha (*HNF4A*) appeared among these differentially methylated *loci*. It remains unclear though whether these changes will remain stable into adulthood and therefore contribute to diabetes risk (or chronic disease risk in general) later in life. In this regard, the authors suggest that epigenetic modifications in multipotent progenitor cells (such as the CD34+ cells analyzed in this study) might influence chronic diseases later in life as the cell population expands over time and induce functional changes during tissue differentiation and maturation. While very attractive, this hypothesis deserves further investigation. In any case, these types of studies are extremely important because of the potential use of DNA methylation at birth as an early marker of future disease risk [104–106].

In another recent set of studies, DNA methylation of several candidates was assessed in cord blood from two independent populations of children with normal birth weights [105,106].

Strikingly, the authors show that the methylation of retinoid X receptor alpha (*RXRα*) and endothelial nitric oxide synthase (*eNOS*) at birth correlated with adiposity by age 9 years [105]. In addition, in a follow-up study, DNA methylation of the promoter region of *eNOS* also correlated with bone mineral density at age 9 years [106]. Thus, these studies constitute the first proof of principle to show that DNA methylation at birth might be a powerful molecular marker (of early nutrition) for later risk of disease (adiposity, bone density). Additional data from other cohorts will validate this concept and additional follow-up studies to define whether these changes in methylation persist well into adulthood.

### 3.2. Adult nutrition during “Dietary Transitions”

As previously mentioned, epigenetic variations are not only restricted to early windows of development and may also occur throughout an individual life-course. However, the amount of data linking adult dietary interventions with epigenetic modifications is much more limited than that for dietary interventions during early development (Figs. 1 and 2), and it is yet unknown whether this is a bias or truly shows differential biological responses to different developmental stages. Regardless, as we will discuss here, dietary factors may influence the epigenome in adult individuals (Tables 1–3). Taking into account the available data, nutrition may induce epigenetic modifications in adults when it fulfills at least these two conditions: First, dietary interventions take place over a long period of time and, second, there is a transition from the previous to a novel type of diet. This is clearly exemplified in numerous animal models: from chow diet-to-high fat diet, from chow diet containing normal protein content-to-chow diet containing low protein content, from *ad lib* feeding-to-caloric restriction (CR), etc.

#### 3.2.1. Chronic high fat feeding

Chronic high fat diet in mice (from weaning until 20 weeks of age) altered patterns of DNA methylation within the promoter regions of the genes encoding tyrosine hydroxylase, the dopamine transporter and the  $\mu$ -opioid receptor in the brain [107,108]. These genes are part of the neurotransmitter systems that participate in the regulation of food intake. Thus, these epigenetically-induced alterations can contribute to the development of obesity and obesity-related diseases occurring later in life. In another rat model, high fat feeding in obese prone rats for 13 weeks resulted in increased transcription of *p16<sup>INK4a</sup>* and *p21<sup>Cip1</sup>* in the liver [109]. These changes, which might contribute to liver disease, occur in response to modifications in the histones residing in the regulatory and coding regions of both genes.

Very recently, an interesting study explored the effect of continuous high fat feeding for three generations on the development of fatty liver in the mouse offspring [110]. At 4–6 weeks of age, C57BL/6 females (F0) were fed with a diet containing 60% Kcal of fat. This high-fat feeding was continued for two more generations, F1 and F2. After this nutritional intervention, the authors report that obesity occurred earlier and became more severe in F2 male offspring than in F1 and F0 mice. Likewise, F2 offspring also developed the highest degree of hepatic steatosis. Hepatic steatosis in F2 mice was accompanied by a transgenerational trend to up-regulate lipogenic genes, including fatty acid synthase (*Fasn*), stearoyl-coenzyme A desaturase 1 (*Scd1*), sterol regulatory element binding protein-1 (*Srebp1*), liver X nuclear receptor alpha (*Lxra*), liver X nuclear receptor beta (*Lxrb*) or the endoplasmic reticulum oxidation 1 (*Ero1a*). Strikingly, *Lxra* and *Ero1a* expression are explained, in part, by reduced relative protein levels of H3K9Me2 and H3K27Me3 binding to their promoter regions. Thus, the authors conclude that the effects described in F2 male offspring



are "presumably consequence of transgenerational accumulation of epigenetic modifications leading to accumulation of lipogenesis in the liver" [110]. In sum, a sustained dietary change for three generations leads to progressive accumulation of epigenetic modifications that may modulate metabolic phenotypes. To note, the effects described in F2 male mice are actually a combination of long dietary interventions, plus the nutritional impact received during development. It will be important to design appropriate experiments to dissect the relative contribution of developmental vs. adult nutrition on the development of fatty liver.

Interestingly, effects of high fat feeding may induce transgenerational (epigenetic) consequences: chronic high fat diet (during 10 weeks, from age 4 weeks) in *male* Sprague–Dawley rats programmed beta-cell dysfunction in their female offspring, which has not been exposed to high fat diet during its development [111]. Beta-cell dysfunction was characterized by altered expression of genes involved in Calcium-, MAPK- and Wnt-signaling pathways. This alteration may be attributed, in part, to changes in DNA methylation. This is exemplified by the interleukin 13 receptor alpha-2 gene (*Il13ra2*), which shows the highest fold change in expression in concordance with hypomethylation of its regulatory region. These authors argue that this is an example of non-genetic, intergenerational transmission of metabolic dysfunction through the paternal lineage. Since males only contribute to their offspring through the information contained in the sperm, it is pointed out that nutritional variations may influence the epigenome not only in somatic cells but also in cells from the germ line. Next, these modifications should remain after the reprogramming of the epigenome during the processes of meiosis and first post-zygotic divisions and inherited into the next generation offspring. While extremely plausible, direct evidence that this is actually happening in germ cells from this model is not experimentally provided [112] and alternative explanations might occur: For example, it might be possible that reported epigenetic alterations occurring in the rat offspring are not inherited from the father, but develop secondarily to the pre-diabetic phenotype that develops in response to the beta-cell dysfunction. Undoubtedly, an accurate analysis of the epigenome of germ cells and sperm will be necessary to ascertain that nutritional imbalances, such as high fat diet, may induce heritable epigenetic modifications in mammals.

### 3.2.2. Low protein diet

Transgenerational effects have also been shown in C57/Bl6 male mice fed a low protein diet from weaning to age 9–12 weeks [113]. Offspring of males fed a low protein diet showed elevated hepatic expression of genes involved in cholesterol and lipid metabolism. Likewise, paternal low protein diet induced numerous changes of DNA methylation, as assessed by microarray analysis, in livers from the offspring. Among positive *loci*, an enhancer of the lipid regulatory protein *PPAR $\alpha$*  was identified [113]. The authors conclude, as in the previous study, that paternal nutrition may programme the epigenome of the germ line that, in turn, might be inherited and influence offspring disease risk, such as lipid–cholesterol metabolism. Again, a direct molecular link has not been shown yet, since the sperm epigenome from low protein fed male mice appeared normal [114]. Thus, the identification of the environmentally-induced epigenetic marks that are transmitted to the offspring will be a matter of intense research over the next years.

### 3.2.3. Diets containing methyl-supplements

A recently published work explored the contribution of a sustained dietary change on the epigenome of isogenic mice over the course of six generations [115]. The authors fed founder mice with methyl-supplements from 2 weeks prior of mating and maintained this diet over 6 generations. They report that such sustained diet

increased DNA methylation variation in liver from the isogenic C57/Bl6 mice. This study concludes that epigenetic modifications (DNA methylation) are stochastic in nature, and occur in both controls and nutritionally-treated mice. But, methyl-supplemented mice show a greater variability on positive differentially methylated *loci*. Again, as previously described by Li et al. [110], the accumulated variation in DNA methylation observed in mice offspring from the sixth generation results from combining inherited- and nutritionally-induced-epigenetic variation.

### 3.2.4. Caloric restriction (CR)

The effects of chronic caloric restriction have deserved special attention to the scientific community since it is, by far, the most powerful mechanism to extend lifespan in many animal models such as yeast, *C. elegans*, *Drosophila* and mammals (mice, rat, and monkeys) [116–118]. It is important to note that CR not only increases maximal lifespan but also delays onset of chronic age-related diseases, including cardiovascular disease, type 2 diabetes, degenerative diseases and cancer in both nonhuman primates and humans [118–122]. Thus, as stated in the title of this review, CR constitutes an example where dietary interventions influence health, as opposed to disease risk. A number of recent reviews have covered the potential role of nutrition involved in aging and longevity through epigenetic mechanisms [123–128]. In this section we will just summarize the main aspects.

CR may exert its beneficial effects on aging-related degenerative diseases through multiple mechanisms, including (1) reduction of oxidative stress and (2) modulation of metabolic pathways through the endocrine system (insulin/IGF1 signaling) [4,129]. More recently, chromatin remodeling has been included as an additional key mechanism in mediating lifespan extension through CR [52,124]. In this regard, early evidences have shown that aging is associated with global DNA hypomethylation, in conjunction with hypermethylation of specific promoter regions, such as cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*p16*), Harvey rat sarcoma virus oncogene (*H-Ras*), runt-related transcription factor (*RUNX*), or retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1 (*TIG1*) [130–135]. Likewise, global DNA hypomethylation has been observed in many different age-related diseases, including cancer, atherosclerosis or neurodegenerative diseases [136,137]. Global DNA hypomethylation and multiple changes in the histone code result in loss of chromatin integrity [138]. There is now emerging data to support that CR mediates its beneficial effects by modulating chromatin function and increasing genomic stability through reversing DNA methylation and increasing global histone deacetylases activity [124]. Thus, it has been shown that CR may reverse aberrant DNA methylation in specific *loci*, such as *H-ras* in rats, or *p16* and *RUNX3* in human samples, but not global hypomethylation associated to the process of aging [139]. Likewise, CR may also reverse aberrant *locus*-specific DNA methylation in age-related disorders such as obesity. Accordingly, short-term CR on obese people may change DNA methylation in specific *loci* including ATPase, class V, type 10a (*ATP10a*), Wilms tumor 1 (*WT1*) or tumor necrosis factor  $\alpha$  (*TNFA*) [140–143]. It has been proposed that these changes might be useful as indicators of diet-induced weight loss responders vs. non-responders. To finish, CR influences expression of specific genes associated to age-related diseases (*p16<sup>INK4a</sup>*, cancer) and senescence (Human Telomerase Reverse Transcriptase, *hTERT*) through modulating the enrichment binding of HDAC1 to their promoter regions [144,145].

### 3.2.5. CR and sirtuins

Recent experimental data suggests that CR mediates its effects through the activation of the members of the Class III of histone deacetylases (HDAC), also known as the sirtuin family. Sirtuins are

NAD<sup>+</sup> dependent HDAC (see section 4) that have been linked to regulation of CR-mediated lifespan [55]. Among mammalian sirtuins, sirtuin 1 (SirT1) is best characterized and has been one of the key players translating CR into biological responses in mammals [146,147]. SirT1 is activated in response to CR and increases lifespan in most model organisms [148]. The role of other sirtuins in mammals in CR-mediated increased lifespan is not clearly established [55]. SirT1 acts as a metabolic sensor and its activation in response to CR mediates a series of metabolic adaptations compatible with aging retardation: (1) Increased stress resistance by regulating the tumor protein p53 and the forkhead box O gene (FOXO); (2) inhibition of lipogenesis and regulation of mitochondrial function and glucose homeostasis [53]. Importantly, the beneficial effects of SirT1 are mediated through directly deacetylating target proteins, such as stress-dependent transcription factors (FOXO, NF- $\kappa$ B, p53), transcription factors involved in regulation of metabolism, including liver X receptor (*LXR*), glucocorticoid receptor (*GR*), peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha (*PGC1 $\alpha$* ) and liver kinase B1 (*LKB1*), or cell growth-proliferation Target of rapamycin (TOR) [149–153]. On the other hand, SirT1 regulates multiple functions through coordination of heterochromatin formation deacetylation of H4K16Ac and H3K9Ac residues [124].

To finish, given the promising role of sirtuins (or at least SirT1 in mammals) in mediating lifespan, the search for activators of sirtuins has been a very active field. In this regard, a component of grape and red wine, resveratrol, has been shown to be a potent activator of SirT1 *in vitro* and *in vivo* [55,142]. Although it is not completely clear whether the effects of resveratrol *in vivo* are SirT1-dependent or independent, its identification opens the possibility of searching for molecules in the diet that might mimic, in part, the beneficial effects of CR. Accordingly, two chemical activators of SirT1 (SRT1720 and SRT2183) have protective effects against age-related effects on metabolic dysfunction [154].

#### 4. HOW do nutrients modify the epigenome? MECHANISMS

So far, along this review we have described that nutrition may induce epigenetic modifications in mammals. But, how do dietary components bring about epigenetic modifications? This question is visually depicted by the black box in the Fig. 3A. Over the last few years, the molecular mechanisms that translate nutritional variation into epigenetic modifications have started to emerge. We will describe the main findings below.

##### 4.1. Nutrition factors and DNA methylation

There are now mounting evidences supporting that nutrients may modify the pattern of DNA methylation, either at the global scale or at locus-specific sites (Table 1). It has been proposed that nutrition influences patterns of DNA methylation in three possible ways (Fig. 4A,B): First, by providing directly the substrates necessary for proper DNA methylation. Second, by providing the cofactors that modulate the enzymatic activity of DNA methyltransferases (DNMTs) which catalyze the incorporation of methyl-groups into DNA. Third, by altering the activity of the enzymes that regulate the methionine cycle (also known as one-carbon cycle) which in turn provide the bioavailability of methyl-groups. Obviously, all 3 mechanisms are not mutually incompatible and may operate together in time. Evidence that supports these three mechanisms is reviewed in more detail below.

##### 4.1.1. Methyl-donors from diet

S-Adenosyl-methionine (SAM) is the universal methyl-donor for methyltransferases, including both DNA methyltransferases and

protein methyltransferases [155] (Fig. 4A). SAM is synthesized in the methionine cycle from several precursors present in the diet, including methionine, folate, choline, betaine and vitamins B2, B6 and B12 (Fig. 4B) (reviewed in [12,56]). All of them enter at different sites in the methionine pathway and contribute to the net synthesis of SAM. Therefore, it has been proposed that reduced availability of methyl donors will result in low SAM synthesis and global DNA hypomethylation. Conversely, increased availability of methyl donors will result in the opposite effect.

Accordingly, it has been shown that diets deficient in methyl donors (no folate, no choline and very low methionine) result in global DNA hypomethylation in rodents [156,157,190–192]. Likewise, low protein diets may result in reduced availability of the methionine precursor homocysteine and lead to DNA hypomethylation [158]. Conversely, maternal diet supplemented with methyl donors increases DNA methylation in specific loci [99,100,159,194]. Whether high methyl-donor intake also results in global DNA hypermethylation remains as yet undetermined.

Although the previous data support the idea that changes in DNA methylation are mediated, in part, through the provision of methyl-donors from diet, recent studies have pointed out to a more complex scenario: First, global methylation profiling, by means of specific microarrays, has shown that, in mice, low protein or 50% global malnutrition during gestation leads to both hypermethylation and hypomethylation at specific loci in the offspring [27] (Martinez and Jimenez-Chillarón, unpublished data). Also, human studies have shown that exposure to maternal folic acid supplementation before or during pregnancy decreased methylation levels at the differential methylation region of H19, which is a negative regulator of IGF2 [195]. Likewise, *in utero* undernutrition in humans resulted in both hypo- and hyper-methylation of different specific loci [101–103]. Although it is not reported whether the amount of methionine (and methyl-donors) is reduced in these specific studies, it is commonly accepted that maternal undernutrition correlates with reduced methyl-donor availability. Thus, an accurate measurement of these precursors will be extremely helpful to understand the role of methyl-donors on the establishment of methyl-DNA. In sum, these and other forthcoming articles point out that there is not a simple correlation between methyl donor concentration and DNA methylation. Hence, other mechanisms might contribute, together with the availability of methyl donors, to set patterns of DNA methylation in cells.

##### 4.1.2. DNMT activity

DNA methyltransferases require SAM as a cofactor for their full activity (Fig. 4B). As we have outlined in the previous section, methyl donors from the diet may contribute to modulate DNMT activity by changing the intracellular concentration of SAM. In addition, dietary polyphenols, such as epigallocatechin 3-gallate (EGCG), found in green tea, or genistein, present in soybean, are able to inhibit DNMT, at least *in vitro* [160]. Genistein may also influence DNA methylation *in vivo*, at least in mice [95,161,193]. Importantly, in one study the authors confirm that genistein does not seem to exert its effects on DNA methylation through the one-carbon cycle because both SAM and S-adenosyl-homocysteine concentrations remained unaltered [161].

The clinical interest that arises from these types of studies is that it is potentially feasible to modulate patterns of DNA methylation by increasing the availability of polyphenols through dietary supplementation. It is questioned, though, whether consumption of these polyphenols from beverages and diets may have any effect on DNA methylation in humans, because they are present at a very low concentrations in a normal diet [162]. As yet, experimental data is lacking to show that this type of supplementation will influence DNA methylation with no side undesired toxic effects. Therefore,

more studies are needed in order to fully establish its viability as a dietary supplement with therapeutic effects.

#### 4.1.3. Activity of enzymes from the methionine cycle

Vitamins B6 and B12 are cofactors involved in the regulation of the catalytic activity of enzymes from the folate cycle, thus determining SAM bioavailability (Fig. 4A,B). Specifically, vitamin B6 regulates the activity of serine hydroxymethyl-transferase (SHMT) favoring the conversion of folic acid into 5,10-methylene THF. Vitamin B12 is a cofactor of the 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase (MTR) that catalyzes the conversion of homocysteine (Hcy) into methionine, the direct precursor of SAM. Therefore, bioavailability of these cofactors may influence DNA methylation by modifying the activity of the one-carbon cycle and the production of SAM [12].

Thus, it is conceivable that supplementing diets with these vitamins will contribute to the maintenance or establishment of DNA methyl marks. An indirect proof of principle is provided by the effects induced by excessive ethanol consumption: High ethanol consumption inhibits the availability of vitamins B6 and B12, thus interfering with the production of SAM and appropriate DNA methylation, through the folate/methionine cycles [163].

## 4.2. Nutrition factors and histone modifications

Histones may undergo a series of post-translational modifications, including methylation, acetylation, SUMOylation, biotinylation, phosphorylation, ubiquitination, or ADP ribosylation, which alter their activity and, therefore, chromatin states (reviewed elsewhere in this special issue of *Biochimie*). There is evidence supporting that nutritional factors may influence some histone modifications.

#### 4.2.1. Nutrition and histone methylation

We have described multiple examples where nutrition changes patterns of histone methylation (Table 2). Similar to their role in DNA methylation described in the previous Section 4.1, dietary methyl donors may contribute to change patterns of histone methylation through the provision of SAM, produced through the one-carbon cycle (Fig. 4A,B).

Histone methylation is a function of the opposing activities of histone methyltransferases (HMTs) and histone demethylases (HDMs). SAM is a cofactor necessary to fully activate HMTs (Fig. 4B). Therefore, dietary methyl donors may modulate levels of histone methylation through the regulation of HMT activity. On the other hand, the activity of histone demethylases may be modulated by metabolic cofactors produced during the metabolism of high-energy nutrients (carbohydrates, proteins or fat). There are two types of HDMs: The LSD1-containing domain demethylases and the JumjC (JmjC) domain containing demethylases [162]. Each type of HDM requires a different coenzyme: the LSD1-containing domain HDM uses flavin adenine dinucleotide (FAD) as a cofactor, whereas the JmjC-containing domain HDM requires  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ -KG) [164,165]. Therefore, as we will discuss later, it is proposed that extracellular nutrient availability will influence histone methylation through metabolism of energy-containing molecules and production of these coenzymes [162]. Nevertheless, a formal demonstration of this hypothesis is as yet lacking and it is unknown whether extracellular nutrient availability will truly change pattern of histone methylation through this proposed mechanism.

#### 4.2.2. Nutrition and histone acetylation

Histone acetylation depends on the opposing activities of histone deacetylases (HDAC) and histone acetyl-transferases (HAT). Many studies show that several nutrients are able to modify the

activity of Histone Deacetylases (HDAC) (Table 2). There exist three classes of histone deacetylases (I, II, III). Classes I and II HDAC are inhibited by short-chain carboxylic acids and polyphenols, whereas Class III HDACs, also known as sirtuins, require nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) as a cofactor.

4.2.2.1. *HDAC I and II*. It is long-known that butyrate, a short-chain carboxylic acid (C4) produced by bacterial carbohydrate fermentation in the intestinal lumen, is a potent inhibitor of Classes I and II HDAC, thus leading to histone hyperacetylation *in vitro* and *in vivo* [166–168]. A series of studies have linked the production of intestinal butyrate with transcriptional regulation mediated by changes in histone acetylation and colon cancer risk. Whether this also applies for metabolic dysfunction is still controversial and needs further evaluation. It has been proposed that diet composition will result in different concentration of butyrate that will lead to a gradient of histone acetylation. This mechanism may theoretically link nutrition, the bacterial flora and epigenetic regulation.

To note, butyrate is not the only fatty acid in mediating changes in histone acetylation: Indeed, acetate (C2), propionate (C3), valerate (C5) and caproate (C6) may also induce hyperacetylation of histones, but to a lesser extent than butyrate (C4) [167]. In addition to carboxylic acids, other dietary compounds, including isothiocyanates and allyl sulfides present in cruciferous plants and garlic respectively, may modulate histone acetylation, through modulation of HDAC and/or HAT activities [169,170].

4.2.2.2. *HDAC III (sirtuins)*. Special attention has recently been received by the Class III of histone deacetylases, also known as sirtuins because they can mediate, in part, the beneficial effects of caloric restriction on lifespan [123,171]. The role of nutritional regulation on Class III HDAC has been recently reviewed [55]. Sirtuins use NAD<sup>+</sup> as cofactor to deacetylate target proteins [172], which is synthesized from amino acids. Thus, hypercaloric diets give rise to a low NAD<sup>+</sup>/NADH ratio and, consequently, low sirtuin activity. Conversely, caloric restriction results in a high NAD<sup>+</sup>/NADH ratio, thus increasing sirtuin 1 activity. Therefore, it has been proposed that sirtuins can mediate nutritional-dependent chromatin states, through its capacity to sense cellular energy state, based on the NAD/NADH ratio [124].

To finish, natural dietary polyphenols may influence histone acetylation through modulating the activity of HDAC or HAT. Thus, it has been shown that SirT1 activity may be modulated by a natural polyphenol, resveratrol, that is particularly abundant in red grapes (and red wine) [173]. Likewise, dietary polyphenols from green tea may act as histone acetyl transferases inhibitors (HAT) [174–176]. Given this relationship it is tempting to suggest that dietary compounds may influence, at least in part, gene expression through modulation of HDAC-HAT activity and resulting in histone hyper- or hypo-acetylation.

#### 4.2.3. Nutrition and other histone modifications

At this point it is not known whether dietary factors may influence other histone marks. It is plausible through, that this might be the case given the fact that nutrients have a wide range of implications in the cell. Nevertheless, the impact of specific dietary components on histone modifications other than methylation or acetylation, thus influencing gene expression and phenotype, remains to be fully characterized.

## 4.3. Nutrition factors and non-coding RNAs

Recently, non-coding RNAs have extended the list of molecular mechanisms with epigenetic regulatory potential [11]. One of the

most widely studied non-coding RNA is the microRNA (miRNA). As reviewed in this special issue of *Biochimie*, miRNAs are a large family of small non-coding RNAs (20–22 nucleotides long). They can regulate expression of up to 30% of the human genome, primarily through post-transcriptional targeting of mRNA. Recent evidences support that a wide range of nutrients, including fat feeding, protein, alcohol, vitamin E, hormones and a number of polyphenols may alter expression of specific miRNAs [177–183,202–205] (Table 3).

Specifically, maternal high fat feeding during gestation and lactation changed the expression of 23 miRNAs in liver from the offspring [177]. Likewise, maternal exposure to ethanol also changed the expression of several miRNAs in the fetal brain from the offspring [178]. At this point, it remains undetermined whether these altered patterns of miRNA expression contribute to increase adult disease risk. Given its wide regulatory capacity it is highly plausible that some of the altered miRNAs may contribute to the development of unhealthy phenotypes later in life.

Likewise, adult Dietary Transitions also contribute to alter either global or specific expression of miRNAs. Thus, supplementing linoleic acid for 4–9 weeks to high fat fed mice changed the expression of lipid/obesity specific miRNAs in white adipose tissue (miR-103, -107) [179]. On the other hand, polyphenols from yaupon holly leaves, such as quercetin, down-regulated the pro-inflammatory miR-155 in mouse macrophages [180]. In addition, vitamin E deficiency in rats (6 months) caused a down-regulation of miR-122a and miR-125b, which contribute to regulate lipid metabolism and inflammation, respectively [181].

At the molecular level, it is not well characterized the way nutrition modulates miRNA abundance. But it is proposed that it can be achieved through transcriptional regulation, via RNA-Pol II, in a similar fashion than mRNAs [179].

#### 4.4. Nutrition: physiological and pharmacological regulation of the epigenome

In this section we will discuss how *dietary nutritional factors* on one hand and *non-nutrient dietary compounds* on the other one

might have clinical relevance. Nutritional factors may play a role as physiological regulators of the epigenome whereas non-nutrients might be relevant as pharmacological modulators of the epigenome (Fig. 5).

##### 4.4.1. Dietary nutritional factors: physiological regulation of the epigenome

Nutrients can be subdivided arbitrarily into two categories: macronutrients and micronutrients. Macronutrients include carbohydrates, protein and fat. Macronutrients are metabolized in the cell, giving rise to a number of intracellular signals, including SAM, FAD,  $\alpha$ -ketoglutarate or  $NAD^+$ , that, in turn, influence the establishment of epigenetic marks (DNA methylation, histone methylation and histone acetylation) (Fig. 3B). Therefore, these cofactors can be considered as intracellular signals that convey extracellular nutritional *status* into epigenetically-derived metabolic responses (phenotypic variation).

It has been recently proposed that ATP might be a potential signal that integrates the energy contained in high-energy macronutrients [162] onto the biosynthesis of these specific coenzymes SAM, FAD and  $\alpha$ -KG (Figs. 3C, 4C and 5). Specifically, ATP is required for the activity of the enzyme S-adenosyl methionine transferase (MAT), which in turn converts methionine into SAM. Likewise, FAD, required for the LSD1-containing domain histone demethylases, depends on ATP for its synthesis.  $\alpha$ -ketoglutarate, the coenzyme for the JmjC class of HDMs, is produced in the TCA cycle from glutamate, through the catalytic action of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase ( $\alpha$ -KGDH). Strikingly, ATP regulates levels of  $\alpha$ -ketoglutarate through inhibition of  $\alpha$ -KGDH activity. To finish, intracellular  $NAD^+$  level also fluctuate in response to extracellular macronutrient availability. During periods of feast ATP/ADP ratios are high and there is net conversion of NAD to NADH (and low sirtuin activation). In contrast, during fasting, or periods of caloric restriction, intracellular concentrations of NAD are high and consequently increased sirtuin activity [55]. In sum, ATP might be a common link between nutrition (i.e. the energetic state of the cell) and the generation of the multiple second-messengers that induce physiological appropriate epigenetic adaptations to intracellular energetic conditions.

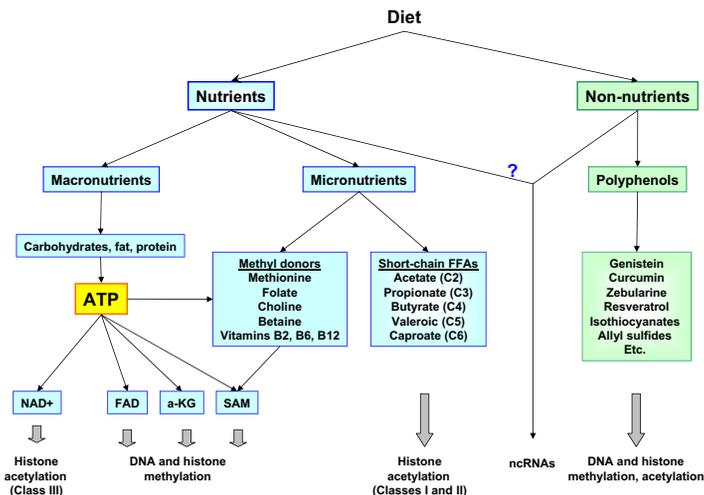


Fig. 5. Epigenetic modifications mediated by dietary compounds: micronutrients, macronutrients and non-nutritional dietary factors.

In the context of this review, we have included the group methyl donors in the class of micronutrients because they are present at a very low concentration in a regular diet. Methyl donors are metabolized through the folate and methionine cycles in order to produce SAM. To note, SAM production through the one-carbon cycle requires ATP. So, although methyl donors may influence SAM content in a substrate concentration-dependent manner, ATP (possibly produced from macronutrient metabolism) is also required in order to provide SAM for DNA and protein methylation. This suggests that micronutrients (or at least methyl donors) at physiological levels do not largely influence the epigenome if additional signals from diet (ATP) are missing. Whether super-physiological pharmacological doses may induce epigenetic modifications independently from ATP (or any other dietary-derived signal) clearly needs further investigation.

#### 4.4.2. Dietary non-nutritional factors: “pharmacological” regulation of the epigenome

Non-nutrient (i.e. non-metabolized) dietary factors may also induce changes in the epigenome (Fig. 5). The main difference with nutrients is that they do not require its own metabolism/oxidation to generate additional signals and messengers that can indeed modify epigenetic marks. Therefore, its influence on the epigenome will largely depend on its bioavailability characterized by its extracellular concentration, its transport into cells and stability.

Despite mounting proof to support that these dietary factors, primarily polyphenols, may induce epigenetic modifications, the question is whether they are physiologically relevant in humans on a normal diet. Generally, these non-nutrient dietary factors are present at very low concentrations and, although may potentially influence the epigenome, their relevance might be limited. In contrast, diets deficient in one or more polyphenols or diets and beverages containing them at pharmacologic levels might have an impact on the epigenome. Nevertheless, more studies are currently needed in order to fully establish their relevance on health and disease.

**To conclude**, diet can remodel chromatin as a function of (1) intracellular energy status and (2) bioavailability of non-nutrient dietary coenzymes.

This distinction leads to the following implications: first, nutrients (both micro- and macro-nutrients) are the main metabolic substrates that influence the epigenome. Therefore, nutritional imbalances, specially occurring during sensitive periods of growth or during chronic Dietary Transitions, may permanently change patterns of gene expression through modifying the epigenome. Second, non-nutrient dietary factors, when present in physiological concentrations, should not largely influence the establishment of epigenetic marks. In contrast, diets deficient in one or more polyphenols or at pharmacologic levels might have an impact. This point is of great relevance because it opens a window for the development of pharmacological or nutritional interventions aimed to modify metabolic phenotypes by influencing, at least in part, the epigenome.

## 5. Final considerations: WHY does nutrition regulate gene expression through epigenetic mechanisms?

The aforementioned studies convincingly show that nutrition during critical periods of development induces epigenetic changes in a variety of organs and thus permanently influences the physiology of the individual. Similarly, long-term dietary interventions (Dietary Transitions) can induce epigenetic changes at least in animal models. Therefore, it is not under debate that nutrition is

influencing the epigenome, but why. In this section, we note the questions that we believe need to be addressed urgently.

In this regard, it has been proposed that the nutritionally-derived epigenetic changes induced during the perinatal development in mammals may be a preparation for the environment-to-be-expected. This is now discussed as the Predictive Adaptive Response Hypothesis [30,31,184]. It states that developing individuals sense their environment as a prediction of the environmental conditions that a foetus/neonate will eventually encounter during adulthood. Thus, such developing individual will adopt physiological and anatomical modifications that will be advantageous in a predicted environmental condition. The epigenome is the substrate where the environment may induce such long-term permanent changes. Thus, the fetal/neonatal epigenome is modified as a reaction to maternal environment *to prepare* the offspring for future environmental clues after birth and therefore increase its evolutionary fitness. Although this hypothesis is compelling for the survival of small, short lived mammals, its significance in humans needs further debate.

Accordingly, we note that, until now, it is not clear whether epigenetic modifications upon maternal malnutrition are a pathological side effect of the shortage in nutrients, or a coordinated response to environmental challenges. It has been proposed that the former is true, mainly based on the fact that maternal undernutrition in animal studies led to hypomethylation of several gene promoters [59]. However, untargeted genome-wide studies have shown that the number of hypermethylated genes under these conditions is comparable to that of hypomethylated genes [27,87,88]. Moreover, pioneering studies on protein restriction have even shown global hypermethylation [67]. Similarly, also the Dutch Famine studies revealed both hypo- and hypermethylated *loci* in individuals perinatally undernourished [103]. This together, points to a directed response rather than a simple shortage of methyl donors.

### 5.1. Final considerations

So far, the DOHaD ideas are merely of academic value, but they might have a strong practical impact in the near future. Many of the epigenetic modifications induced by nutrition can be assessed in peripheral blood, as exemplified by the Dutch Famine data [102,103]. Therefore, they may be useful as additional biomarkers to retrospectively determine nutrient deficiency and prospectively to define individuals at risk for metabolic diseases. This is linked to a potential application of nutrients as epigenetic modifiers: opposite to the fetal situation, the newborn is easily reachable by nutritional manipulations. This means that early (baby) nutrition may in future be used to epigenetically program an individual which is less susceptible to chronic disease at adult age. This could even be combined with the aforementioned use of epigenetic biomarkers. However, this use clearly needs not only further scientific but also ethical consideration which goes far beyond the focus of this review.

More and more studies now focus on the influence of the gut microbiota for human health, especially with regards to the development of obesity. It has been demonstrated in mouse models that germ-free mice consume more food but accumulate less body fat than conventional, non-germ free mice [185]. Colonization of germ-free mice by conventional murine bacterial flora induces hepatic lipogenesis in the host. Moreover, germ-free mice are protected from high-fat diet induced obesity. Lastly, it has been demonstrated that the colonic flora of obese mice (ob/ob) varies from that of lean control mice; when transferred to germ-free mice, the recipients of the ob/ob-derived flora showed a significantly higher fat gain [186]. Interestingly, the bacterial flora produces large quantities of specific metabolites. It has been proposed that

these metabolites directly influence gene expression in the host and, hence, influence metabolic rates [187,188]. It is important to note that these substances include several epigenetic modifiers (folate, butyrate) which in large quantities reach the intestinal epithelium, epithelial stem cells and, via the portal system, the liver. The epigenetic properties of folate and butyrate have extensively been discussed above. In our opinion future research needs to investigate to what extent these bacterial metabolites influence the epigenome of the host.

In summary, it has been known for a long time that the composition of the diet, and adequate amount, are a pre-requisite for a healthy life. Charles Dickens, with whom we started this review, already knew about healthy infant nutrition. Data from the last two decades now prove that this needs to be extended to even the fetal period. Thus the old saying *you are what you eat* is too simple and we should start considering that in addition *you are what your parents ate*.

## Acknowledgments

We apologize to researchers whose work could not be cited due to space limitation. We thank the helpful comments from three anonymous reviewers that have contributed to improve the quality of the original manuscript.

## References

- [1] R. Horton, Maternal and child undernutrition: an urgent opportunity, *Lancet* 371 (2008) 179.
- [2] C.G. Victora, L. Adair, C. Fall, et al., Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital, *Lancet* 371 (2008) 340–357.
- [3] P. Saenger, P. Czernichow, I. Hughes, E.O. Reiter, Small for gestational age: short stature and beyond, *Endocr. Rev.* 28 (2007) 219–251.
- [4] S.J. Russell, C.R. Kahn, Endocrine regulation of ageing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 681–691.
- [5] G.M. Reaven, The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment, *Annu. Rev. Nutr.* 25 (2005) 391–406.
- [6] M.F. Fraga, R. Agrelo, M. Esteller, Cross-talk between aging and cancer: the epigenetic language, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1100 (2007) 60–74.
- [7] S. Huang, Histone methyltransferases, diet nutrients and tumour suppressors, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 469–476.
- [8] J.A. Milner, Nutrition and cancer: essential elements for a roadmap, *Cancer Lett.* 269 (2008) 189–198.
- [9] J.A. Milner, Diet and cancer: facts and controversies, *Nutr. Cancer* 56 (2006) 216–224.
- [10] R. Jaenisch, A. Bird, Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nat. Genet.* 33 (Suppl) (2003) 245–254.
- [11] B.E. Bernstein, A. Meissner, E.S. Lander, The mammalian epigenome, *Cell* 128 (2007) 669–681.
- [12] R. Feil, M.F. Fraga, Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications, *Nat. Rev. Genet.* 13 (2012) 97–109.
- [13] R.L. Jirtle, M.K. Skinner, Environmental epigenomics and disease susceptibility, *Nat. Rev. Genet.* 8 (2007) 253–262.
- [14] P.D. Gluckman, Epigenetics and metabolism in 2011: epigenetics, the life-course and metabolic disease, *Nat. Rev. Endocrinol.* 8 (2011) 74–76.
- [15] C. Gallow-Kabani, C. Junien, Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic, *Diabetes* 54 (2005) 1899–1906.
- [16] D.J. Barker, C. Osmond, Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales, *Lancet* 1 (1986) 1077–1081.
- [17] D.J. Barker, A.R. Bull, C. Osmond, S.J. Simmonds, Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life, *BMJ* 301 (1990) 259–262.
- [18] C.N. Hales, D.J. Barker, P.M. Clark, et al., Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64, *BMJ* 303 (1991) 1019–1022.
- [19] C.H. Fall, D.J. Barker, C. Osmond, P.D. Winter, P.M. Clark, C.N. Hales, Relation of infant feeding to adult serum cholesterol concentration and death from ischaemic heart disease, *BMJ* 304 (1992) 801–805.
- [20] D.J. Barker, The developmental origins of chronic adult disease, *Acta Paediatr. Suppl.* 93 (2004) 26–33.
- [21] P.D. Gluckman, M.A. Hanson, A.S. Beedle, Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective, *Am. J. Hum. Biol.* 19 (2007) 1–19.
- [22] P.D. Gluckman, M.A. Hanson, C. Cooper, K.L. Thornburg, Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 61–73.
- [23] C.N. Hales, D.J. Barker, Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis, *Diabetologia* 35 (1992) 595–601.
- [24] C.N. Hales, D.J. Barker, The thrifty phenotype hypothesis, *Br. Med. Bull.* 60 (2001) 5–20.
- [25] J.C. Jimenez-Chillaron, Beta-cell Secretory Dysfunction in the Pathogenesis of Low Birth Weight-Associated Diabetes: A Murine Model (2005).
- [26] J.C. Jimenez-Chillaron, M. Hernandez-Valencia, A. Lightner, et al., Reductions in caloric intake and early postnatal growth prevent glucose intolerance and obesity associated with low birthweight, *Diabetologia* 49 (2006) 1974–1984.
- [27] E.M. van Straten, V.W. Bloks, N.C. Huijckman, et al., The liver X-receptor gene promoter is hypermethylated in a mouse model of prenatal protein restriction, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298 (2010) R275–R282.
- [28] T. Pentinat, M. Ramon-Krauel, J. Cebria, R. Diaz, J.C. Jimenez-Chillaron, Transgenerational inheritance of glucose intolerance in a mouse model of neonatal overnutrition, *Endocrinology* 151 (2010) 5617–5623.
- [29] I.C. McMillen, J.S. Robinson, Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming, *Physiol. Rev.* 85 (2005) 571–633.
- [30] P.D. Gluckman, M.A. Hanson, Living with the past: evolution, development, and patterns of disease, *Science* 305 (2004) 1733–1736.
- [31] P.D. Gluckman, M.A. Hanson, The developmental origins of the metabolic syndrome, *Trends Endocrinol. Metab.* 15 (2004) 183–187.
- [32] P. Monaghan, Early growth conditions, phenotypic development and environmental change, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363 (2008) 1635–1645.
- [33] G.N. Corry, B. Tanasijevic, E.R. Barry, W. Krueger, T.P. Rasmussen, Epigenetic regulatory mechanisms during preimplantation development, *Birth Defects Res. C. Embryo. Today* 87 (2009) 297–313.
- [34] W. Reik, Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development, *Nature* 447 (2007) 425–432.
- [35] F. Santos, B. Hendrich, W. Reik, W. Dean, Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo, *Dev. Biol.* 241 (2002) 172–182.
- [36] H.D. Morgan, F. Santos, K. Green, W. Dean, W. Reik, Epigenetic reprogramming in mammals, *Hum. Mol. Genet.* 14 (Spec. No. 1) (2005) R47–R58.
- [37] D.J. Lees-Murdock, C.P. Walsh, DNA methylation reprogramming in the germ line, *Epigenetics* 3 (2008) 5–13.
- [38] C. Faulk, D.C. Dolinsky, Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals, *Epigenetics* 6 (2011) 791–797.
- [39] L.H. Lumey, A.C. Ravelli, L.G. Wiessing, J.G. Koppe, P.E. Treffers, Z.A. Stein, The Dutch famine birth cohort study: design, validation of exposure, and selected characteristics of subjects after 43 years follow-up, *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 7 (1993) 354–367.
- [40] L.H. Lumey, A.D. Stein, A.C. Ravelli, Timing of prenatal starvation in women and birth weight in their first and second born offspring: the Dutch Famine Birth Cohort study, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 61 (1995) 23–30.
- [41] T. Roseboom, S. de Rooij, R. Painter, The Dutch famine and its long-term consequences for adult health, *Eur. J. Hum. Dev.* 82 (2006) 485–491.
- [42] T.J. Roseboom, J.H. van der Meulen, C. Osmond, D.J. Barker, A.C. Ravelli, O.P. Bleker, Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the Dutch famine, *Am. J. Clin. Nutr.* 72 (2000) 1101–1106.
- [43] T.J. Roseboom, J.H. van der Meulen, C. Osmond, et al., Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944–45, *Heart* 84 (2000) 595–598.
- [44] S.R. de Rooij, H. Wouters, J.E. Yonker, R.C. Painter, T.J. Roseboom, Prenatal undernutrition and cognitive function in late adulthood, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 16881–16886.
- [45] C.E. Lopuhaa, T.J. Roseboom, C. Osmond, et al., Atopy, lung function, and obstructive airways disease after prenatal exposure to famine, *Thorax* 55 (2000) 555–561.
- [46] R.C. Painter, T.J. Roseboom, G.A. van Montfrans, et al., Microalbuminuria in adults after prenatal exposure to the Dutch famine, *J. Am. Soc. Nephrol.* 16 (2005) 189–194.
- [47] A.C. Ravelli, J.H. van der Meulen, R.P. Michels, et al., Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine, *Lancet* 351 (1998) 173–177.
- [48] M.F. Fraga, E. Ballestar, M.F. Paz, et al., Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 10604–10609.
- [49] P. Poulsen, M. Esteller, A. Vaag, M.F. Fraga, The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases, *Paediatr. Res.* 61 (2007) 38R–42R.
- [50] G. Vogt, M. Huber, M. Thiemann, G. van den Boogaart, O.J. Schmitz, C.D. Schubart, Production of different phenotypes from the same genotype in the same environment by developmental variation, *J. Exp. Biol.* 211 (2008) 510–523.
- [51] Z.A. Kaminsky, T. Tang, S.C. Wang, et al., DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins, *Nat. Genet.* 41 (2009) 240–245.
- [52] S. Rodriguez-Rodero, J.L. Fernandez-Morera, A.F. Fernandez, E. Menendez-Torre, M.F. Fraga, Epigenetic regulation of aging, *Discov. Med.* 10 (2010) 225–233.
- [53] Y. Li, M. Daniel, T.O. Tollefsbol, Epigenetic regulation of caloric restriction in aging, *BMC Med.* 9 (2011) 98.
- [54] J.E. Cropley, T.H. Dang, D.I. Martin, C.M. Suter, The penetrance of an epigenetic trait in mice is progressively yet reversibly increased by selection and environment, *Proc. Biol. Sci.* (2012).

- [55] A. Chalkiadaki, L. Guarente, Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability, *Nat. Rev. Endocrinol.* (2012).
- [56] J.A. McKay, J.C. Mathers, Diet induced epigenetic changes and their implications for health, *Acta Physiol. (Oxf)* 202 (2011) 103–118.
- [57] J. Wang, Z. Wu, D. Li, et al., Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome, *Antioxid. Redox Signal.* (2012).
- [58] N.K. MacLennan, S.J. James, S. Melnyk, et al., Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats, *Physiol. Genomics* 18 (2004) 43–50.
- [59] K.A. Lillycrop, E.S. Phillips, A.A. Jackson, M.A. Hanson, G.C. Burdge, Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring, *J. Nutr.* 135 (2005) 1382–1386.
- [60] N. Raychaudhuri, S. Raychaudhuri, M. Thamotharan, S.U. Devaskar, Histone code modifications repress glucose transporter 4 expression in the intrauterine growth-restricted offspring, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 13611–13626.
- [61] J.H. Park, D.A. Stoffers, R.D. Nicholls, R.A. Simmons, Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 2316–2324.
- [62] Q. Fu, X. Yu, C.W. Callaway, R.H. Lane, R.A. McKnight, Epigenetics: intrauterine growth retardation (IUGR) modifies the histone code along the rat hepatic IGF-1 gene, *FASEB J.* 23 (2009) 2438–2449.
- [63] Z. Vucetic, J. Kimmel, K. Totoki, E. Hollenbeck, T.M. Reyes, Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes, *Endocrinology* 151 (2010) 4756–4764.
- [64] B. Coupe, V. Amarger, I. Grit, A. Benani, P. Parnet, Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin, *Endocrinology* 151 (2010) 702–713.
- [65] I. Sandovici, N.H. Smith, M.D. Nitter, et al., Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter-enhancer interaction at the Hnf4a gene in rat pancreatic islets, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 5449–5454.
- [66] R.F. Thompson, M.J. Fazzari, H. Niu, N. Barzilai, R.A. Simmons, J.M. Grealley, Experimental intrauterine growth restriction induces alterations in DNA methylation and gene expression in pancreatic islets of rats, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 15111–15118.
- [67] W.D. Rees, S.M. Hay, D.S. Brown, C. Antipatis, R.M. Palmer, Maternal protein deficiency causes hypermethylation of DNA in the livers of rat fetuses, *J. Nutr.* 130 (2000) 1821–1826.
- [68] X. Ke, Q. Lei, S.J. James, et al., Uteroplacental insufficiency affects epigenetic determinants of chromatin structure in brains of neonatal and juvenile IUGR rats, *Physiol. Genomics* 25 (2006) 16–28.
- [69] G.C. Burdge, J. Slater-Jefferies, C. Torrens, E.S. Phillips, M.A. Hanson, K.A. Lillycrop, Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations, *Br. J. Nutr.* 97 (2007) 435–439.
- [70] K.A. Lillycrop, J.L. Slater-Jefferies, M.A. Hanson, K.M. Godfrey, A.A. Jackson, G.C. Burdge, Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications, *Br. J. Nutr.* 97 (2007) 1064–1073.
- [71] K.A. Lillycrop, E.S. Phillips, C. Torrens, M.A. Hanson, A.A. Jackson, G.C. Burdge, Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR alpha promoter of the offspring, *Br. J. Nutr.* 100 (2008) 278–282.
- [72] G.C. Burdge, K.A. Lillycrop, E.S. Phillips, J.L. Slater-Jefferies, A.A. Jackson, M.A. Hanson, Folic acid supplementation during the juvenile-pubertal period in rats modifies the phenotype and epigenotype induced by prenatal nutrition, *J. Nutr.* 139 (2009) 1054–1060.
- [73] E.M. van Straten, Sex-Dependent Programming of Glucose and Fatty Acid Metabolism in Mouse Offspring by Maternal Protein Restriction (2012).
- [74] I. Bogdarina, S. Welham, P.J. King, S.P. Burns, A.J. Clark, Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension, *Circ. Res.* 100 (2007) 520–526.
- [75] I. Bogdarina, A. Haase, S. Langley-Evans, A.J. Clark, Glucocorticoid effects on the programming of AT1b angiotensin receptor gene methylation and expression in the rat, *PLoS One* 5 (2010) e9237.
- [76] C. Jousse, L. Parry, S. Lambert-Langlais, et al., Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome, *FASEB J.* 25 (2011) 3271–3278.
- [77] F.L. Lueder, E.S. Ogata, Uterine artery ligation in the maternal rat alters fetal tissue glucose utilization, *Pediatr. Res.* 28 (1990) 464–468.
- [78] R.H. Lane, A.S. Flozak, E.S. Ogata, G.I. Bell, R.A. Simmons, Altered hepatic gene expression of enzymes involved in energy metabolism in the growth-retarded fetal rat, *Pediatr. Res.* 39 (1996) 390–394.
- [79] K.D. Nusken, H. Schneider, C. Plank, et al., Fetal programming of gene expression in growth-restricted rats depends on the cause of low birth weight, *Endocrinology* 152 (2011) 1327–1335.
- [80] Q. Fu, R.A. McKnight, X. Yu, C.W. Callaway, R.H. Lane, Growth retardation alters the epigenetic characteristics of hepatic dual specificity phosphatase 5, *FASEB J.* 20 (2006) 2127–2129.
- [81] D.N. Tosh, Q. Fu, C.W. Callaway, et al., Epigenetics of programmed obesity: alteration in IUGR rat hepatic IGF1 mRNA expression and histone structure in rapid vs. delayed postnatal catch-up growth, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299 (2010) G1023–G1029.
- [82] G. Sohi, K. Marchand, A. Revesz, E. Arany, D.B. Hardy, Maternal protein restriction elevates cholesterol in adult rat offspring due to repressive changes in histone modifications at the cholesterol 7alpha-hydroxylase promoter, *Mol. Endocrinol.* 25 (2011) 785–798.
- [83] X. Ke, R.A. McKnight, D. Caprau, et al., Intrauterine growth restriction affects hippocampal dual specificity phosphatase 5 gene expression and epigenetic characteristics, *Physiol. Genomics* 43 (2011) 1160–1169.
- [84] X. Ke, M.E. Schober, R.A. McKnight, et al., Intrauterine growth retardation affects expression and epigenetic characteristics of the rat hippocampal glucocorticoid receptor gene, *Physiol. Genomics* 42 (2010) 177–189.
- [85] M. Baserga, R. Kaur, M.A. Hale, et al., Fetal growth restriction alters transcription factor binding and epigenetic mechanisms of renal 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in a sex-specific manner, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299 (2010) R334–R342.
- [86] L.A. Joss-Moore, K.H. Albertine, R.H. Lane, Epigenetics and the developmental origins of lung disease, *Mol. Genet. Metab.* 104 (2011) 61–66.
- [87] A. Unterberger, M. Szyf, P.W. Nathanielsz, L.A. Cox, Organ and gestational age effects of maternal nutrient restriction on global methylation in fetal baboons, *J. Med. Primatol.* 38 (2009) 219–227.
- [88] M.J. Nijland, K. Mitsuya, C. Li, et al., Epigenetic modification of fetal baboon hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase following exposure to moderately reduced nutrient availability, *J. Physiol.* 588 (2010) 1349–1359.
- [89] K.J. Dudley, D.M. Sloboda, K.L. Connor, J. Beltrand, M.H. Vickers, Offspring of mothers fed a high fat diet display hepatic cell cycle inhibition and associated changes in gene expression and DNA methylation, *PLoS One* 6 (2011) e21662.
- [90] K.D. Bruce, F.R. Gagampang, M. Argenton, et al., Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression, *Hepatology* 50 (2009) 1796–1808.
- [91] K.M. Aagaard-Tillery, K. Grove, J. Bishop, et al., Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: maternal diet modifies the primate fetal epigenome, *J. Mol. Endocrinol.* 41 (2008) 91–102.
- [92] A. Plagemann, T. Harder, M. Brunn, et al., Hypothalamic proinflammatory promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome, *J. Physiol.* 587 (2009) 4963–4976.
- [93] A. Plagemann, K. Roeplek, T. Harder, et al., Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding, *J. Perinat. Med.* 38 (2010) 393–400.
- [94] V.K. Rakyant, M.E. Blewitt, R. Drucker, J.L. Preis, E. Whitelaw, Metastable epialleles in mammals, *Trends Genet.* 18 (2002) 348–351.
- [95] D.C. Dolinsky, D. Huang, R.L. Jirtle, Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 13056–13061.
- [96] D.C. Dolinsky, The agouti mouse model: an epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome, *Nutr. Rev.* 66 (Suppl. 1) (2008) S7–11.
- [97] D.C. Dolinsky, J.R. Weidman, R.L. Jirtle, Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease, *Reprod. Toxicol.* 23 (2007) 297–307.
- [98] H.D. Morgan, H.G. Sutherland, D.I. Martin, E. Whitelaw, Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse, *Nat. Genet.* 23 (1999) 314–318.
- [99] R.A. Waterland, R.L. Jirtle, Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 5293–5300.
- [100] R.A. Waterland, D.C. Dolinsky, J.R. Lin, C.A. Smith, X. Shi, K.G. Tahiliani, Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin fused, *Genesis* 44 (2006) 401–406.
- [101] R.A. Waterland, R. Kellermayer, E. Laritsky, et al., Season of conception in rural gambia affects DNA methylation at putative human metastable epialleles, *PLoS Genet.* 6 (2010) e1001252.
- [102] B.T. Heijmans, E.W. Tobin, A.D. Stein, et al., Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 17046–17049.
- [103] E.W. Tobin, L.H. Lumey, R.P. Talens, et al., DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific, *Hum. Mol. Genet.* 18 (2009) 4046–4053.
- [104] F. Einstein, R.F. Thompson, T.D. Bhagat, et al., Cytosine methylation dysregulation in neonates following intrauterine growth restriction, *PLoS One* 5 (2010) e8887.
- [105] K.M. Godfrey, A. Sheppard, P.D. Gluckman, et al., Epigenetic gene promoter methylation at birth is associated with child's later adiposity, *Diabetes* 60 (2011) 1528–1534.
- [106] N.C. Harvey, K.A. Lillycrop, E. Garratt, et al., Evaluation of methylation status of the eNOS promoter at birth in relation to childhood bone mineral content, *Calcif. Tissue Int.* 90 (2012) 120–127.
- [107] Z. Vucetic, J. Kimmel, T.M. Reyes, Chronic high-fat diet drives postnatal epigenetic regulation of  $\mu$ -opioid receptor in the brain, *Neuropsychopharmacology* 36 (2011) 1199–1206.
- [108] Z. Vucetic, J.L. Carlin, K. Totoki, T.M. Reyes, Epigenetic dysregulation of the dopamine system in diet-induced obesity, *J. Neurochem.* (2012).
- [109] X. Zhang, D. Zhou, R.S. Strakovsky, Y. Zhang, Y.X. Pan, Hepatic cellular senescence pathway genes are induced through histone modifications in

- a diet-induced obese rat model, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* (2011).
- [110] J. Li, J. Huang, J.S. Li, H. Chen, K. Huang, L. Zheng, Accumulation of endoplasmic reticulum stress and lipogenesis in the liver through generational effects of high fat diets, *J. Hepatol.* (2011).
- [111] S.F. Ng, R.C. Lin, D.R. Laybutt, R. Barres, J.A. Owens, M.J. Morris, Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring, *Nature* 467 (2010) 963–966.
- [112] M.K. Skinner, Metabolic disorders: fathers' nutritional legacy, *Nature* 467 (2010) 922–923.
- [113] B.R. Carone, L. Fauquier, N. Habib, et al., Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals, *Cell* 143 (2010) 1084–1096.
- [114] A.C. Ferguson-Smith, M.E. Patti, You are what your dad ate, *Cell. Metab.* 13 (2011) 115–117.
- [115] C.C. Li, J.E. Cropley, M.J. Cowley, T. Preiss, D.I. Martin, C.M. Suter, A sustained dietary change increases epigenetic variation in isogenic mice, *PLoS Genet.* 7 (2011) e1001380.
- [116] C.M. McCay, M.F. Crowell, L.A. Maynard, The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size, 1935, *Nutrition* 5 (1989) 155–171. discussion 172.
- [117] T.M. Cooper, R.J. Mockett, B.H. Sohail, R.S. Sohail, W.C. Orr, Effect of caloric restriction on life span of the housefly, *Musca domestica*, *FASEB J.* 18 (2004) 1591–1593.
- [118] R.J. Colman, R.M. Anderson, S.C. Johnson, et al., Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys, *Science* 325 (2009) 201–204.
- [119] L. Fontana, S. Klein, J.O. Holloszy, Long-term low-protein, low-calorie diet and endurance exercise modulate metabolic factors associated with cancer risk, *Am. J. Clin. Nutr.* 84 (2006) 1456–1462.
- [120] L. Fontana, D.T. Villareal, E.P. Weiss, et al., Calorie restriction or exercise: effects on coronary heart disease risk factors. A randomized, controlled trial, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293 (2007) E197–E202.
- [121] J.O. Holloszy, L. Fontana, Caloric restriction in humans, *Exp. Gerontol.* 42 (2007) 709–712.
- [122] L. Fontana, S. Klein, J.O. Holloszy, Effects of long-term caloric restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production, *Age (Dordr)* 32 (2010) 97–108.
- [123] L. Guarente, F. Picard, Calorie restriction – the SIR2 connection, *Cell* 120 (2005) 473–482.
- [124] A. Vaquero, D. Reinberg, Calorie restriction and the exercise of chromatin, *Genes Dev.* 23 (2009) 1849–1869.
- [125] L.A. Wakeling, L.J. Ions, D. Ford, Could Sirt1-mediated epigenetic effects contribute to the longevity response to dietary restriction and be mimicked by other dietary interventions? *Age (Dordr)* 31 (2009) 327–341.
- [126] D. Ford, L.J. Ions, F. Alatawi, L.A. Wakeling, The potential role of epigenetic responses to diet in ageing, *Proc. Nutr. Soc.* 70 (2011) 374–384.
- [127] M.D. Nucleus, D.S. Lupu, Nutritional influence on epigenetics and effects on longevity, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 14 (2011) 35–40.
- [128] L.K. Park, S. Friso, S.W. Choi, Nutritional influences on epigenetics and age-related disease, *Proc. Nutr. Soc.* 71 (2012) 75–83.
- [129] L.M. Redman, E. Ravussin, Endocrine alterations in response to caloric restriction in humans, *Mol. Cell. Endocrinol.* 299 (2009) 129–136.
- [130] V.L. Wilson, R.A. Smith, S. Ma, R.G. Cutler, Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 9948–9951.
- [131] J.P. Issa, Y.L. Ottaviano, P. Celano, S.R. Hamilton, N.E. Davidson, S.B. Baylin, Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon, *Nat. Genet.* 7 (1994) 536–540.
- [132] J.P. Issa, P.M. Vertino, C.D. Boehm, I.F. Newsham, S.B. Baylin, Switch from monoallelic to biallelic human IGf2 promoter methylation during aging and carcinogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 11757–11762.
- [133] T. Waki, G. Tamura, M. Sato, T. Motoyama, Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples, *Oncogene* 22 (2003) 4128–4133.
- [134] T. Waki, G. Tamura, M. Sato, M. Terashima, S. Nishizuka, T. Motoyama, Promoter methylation status of DAP-kinase and RUNX3 genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia, *Cancer Sci.* 94 (2003) 360–364.
- [135] M. Esteller, Epigenetics in cancer, *N. Engl. J. Med.* 358 (2008) 1148–1159.
- [136] A. Agrawal, J. Tay, G.E. Yang, S. Agrawal, S. Gupta, Age-associated epigenetic modifications in human DNA increase its immunogenicity, *Aging (Albany NY)* 2 (2010) 93–100.
- [137] R.J. Wierda, S.B. Geutskens, J.W. Jukema, P.H. Quax, P.J. van den Elsen, Epigenetics in atherosclerosis and inflammation, *J. Cell. Mol. Med.* 14 (2010) 1225–1240.
- [138] A.R. Heydari, A. Unnikrishnan, L.V. Lucente, A. Richardson, Caloric restriction and genomic stability, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 7485–7496.
- [139] Y. Li, L. Liu, T.O. Tollefsbol, Glucose restriction can extend normal cell lifespan and impair precancerous cell growth through epigenetic control of hTERT and p16 expression, *FASEB J.* 24 (2010) 1442–1453.
- [140] J. Campion, F.I. Milagro, J.A. Martinez, Individuality and epigenetics in obesity, *Obes. Rev.* 10 (2009) 383–392.
- [141] L. Bouchard, R. Rabasa-Lhoret, M. Fara, et al., Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction, *Am. J. Clin. Nutr.* 91 (2010) 309–320.
- [142] F.I. Milagro, J. Campion, P. Cordero, et al., A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss, *FASEB J.* 25 (2011) 1378–1389.
- [143] J. Campion, F.I. Milagro, E. Goyenechea, J.A. Martinez, TNF-alpha promoter methylation as a predictive biomarker for weight-loss response, *Obes. (Silver Spring)* 17 (2009) 1293–1297.
- [144] M. Meyerson, C.M. Counter, E.N. Eaton, et al., hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization, *Cell* 90 (1997) 785–795.
- [145] T. Kanaya, S. Kyo, M. Takakura, H. Ito, M. Namiki, M. Inoue, hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma, *Int. J. Cancer* 78 (1998) 539–543.
- [146] S.J. Lin, P.A. Defossez, L. Guarente, Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*, *Science* 289 (2000) 2126–2128.
- [147] I.B. Leibiger, P.O. Berggren, Sirt1: a metabolic master switch that modulates lifespan, *Nat. Med.* 12 (2006) 34–36. discussion 36.
- [148] D.K. Ingram, M. Zhu, J. Mamczar, et al., Calorie restriction mimetics: an emerging research field, *Aging Cell.* 5 (2006) 97–108.
- [149] J.T. Rodgers, C. Lerin, W. Haas, S.P. Gygi, B.M. Spiegelman, P. Puigserver, Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1, *Nature* 434 (2005) 113–118.
- [150] H. Li, C.K. Tsang, M. Watkins, P.G. Bertram, X.F. Zheng, Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter, *Nature* 442 (2006) 1058–1061.
- [151] R. Amat, G. Solanes, M. Giral, F. Villarroya, SIRT1 is involved in glucocorticoid-mediated control of uncoupling protein-3 gene transcription, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 34066–34076.
- [152] X. Li, S. Zhang, G. Blander, J.G. Tse, M. Krieger, L. Guarente, SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor RXR, *Mol. Cell.* 28 (2007) 91–106.
- [153] R. Amat, A. Planavila, S.L. Chen, R. Iglesias, M. Giral, F. Villarroya, SIRT1 controls the transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator-1alpha (PGC-1alpha) gene in skeletal muscle through the PGC-1alpha autoregulatory loop and interaction with MyoD, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 21872–21880.
- [154] J.N. Feige, M. Lagouge, C. Cantó, et al., Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation, *Cell. Metab.* 8 (2008) 347–358.
- [155] W.A. Loenen, S-Adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything? *Biochem. Soc. Trans.* 34 (2006) 330–333.
- [156] I.P. Pogribny, A.R. Karpf, S.R. James, S. Melnyk, T. Han, V.P. Tryndyak, Epigenetic alterations in the brains of Fisher 344 rats induced by long-term administration of folate/methyl-deficient diet, *Brain Res.* 1237 (2008) 25–34.
- [157] I.P. Pogribny, V.P. Tryndyak, T.V. Bagnyukova, et al., Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet, *J. Hepatol.* 51 (2009) 176–186.
- [158] R. Demicne, G.V. Portari, J.S. Marchini, H. Vannucchi, A.A. Jordao, Effects of a low-protein diet on plasma amino acid and homocysteine levels and oxidative status in rats, *Ann. Nutr. Metab.* 54 (2009) 202–207.
- [159] R.A. Waterland, M. Trivisano, K.G. Tahiliani, M.T. Rached, S. Mirza, Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity, *Int. J. Obes. (Lond)* 32 (2008) 1373–1379.
- [160] M. Fang, D. Chen, C.S. Yang, Dietary polyphenols may affect DNA methylation, *J. Nutr.* 137 (2007) 2235–2238.
- [161] D.C. Dolinoy, J.R. Weidman, R.A. Waterland, R.L. Jirtle, Maternal genistein alters coat color and protects A<sup>y</sup> mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome, *Environ. Health Perspect.* 114 (2006) 567–572.
- [162] R. Teperino, K. Schoonjans, J. Auwerx, Histone methyl transferases and demethylases; can they link metabolism and transcription? *Cell. Metab.* 12 (2010) 321–327.
- [163] M.S. Ballard, M. Sun, J. Ko, Vitamin A, folate, and choline as a possible preventive intervention to fetal alcohol syndrome, *Med. Hypotheses* (2012).
- [164] R. Anand, R. Marmorstein, Structure and mechanism of lysine-specific demethylase enzymes, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 35425–35429.
- [165] Y. Tsukada, J. Fang, H. Erdjument-Bromage, et al., Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins, *Nature* 439 (2006) 811–816.
- [166] L. Sealy, R. Chalkley, The effect of sodium butyrate on histone modification, *Cell* 14 (1978) 115–121.
- [167] J.R. Davie, Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate, *J. Nutr.* 133 (2003) 2485S–2493S.
- [168] D.C. Drummond, C.O. Noble, D.B. Kirpotin, Z. Guo, G.K. Scott, C.C. Benz, Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 (2005) 495–528.
- [169] B. Delage, R.H. Dashwood, Dietary manipulation of histone structure and function, *Annu. Rev. Nutr.* 28 (2008) 347–366.
- [170] H. Nian, B. Delage, E. Ho, R.H. Dashwood, Modulation of histone deacetylase activity by dietary isothiocyanates and allyl sulfides: studies with sulforaphane and garlic organosulfur compounds, *Environ. Mol. Mutagen.* 50 (2009) 213–221.
- [171] M.J. Holness, P.W. Caton, M.C. Sugden, Acute and long-term nutrient-led modifications of gene expression: potential role of SIRT1 as a central coordinator of short and longer-term programming of tissue function, *Nutrition* 26 (2010) 491–501.



- [172] S. Imai, C.M. Armstrong, M. Kaerberlein, L. Guarente, Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase, *Nature* 403 (2000) 795–800.
- [173] J.A. Baur, D.A. Sinclair, Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 493–506.
- [174] S.K. Kang, S.H. Cha, H.G. Jeon, Curcumin-induced histone hypoacetylation enhances caspase-3-dependent glioma cell death and neurogenesis of neural progenitor cells, *Stem Cells Dev.* 15 (2006) 165–174.
- [175] J. Kang, J. Chen, Y. Shi, J. Jia, Y. Zhang, Curcumin-induced histone hypoacetylation: the role of reactive oxygen species, *Biochem. Pharmacol.* 69 (2005) 1205–1213.
- [176] K.C. Choi, M.G. Jung, Y.H. Lee, et al., Epigallocatechin-3-gallate, a histone acetyltransferase inhibitor, inhibits EBV-induced B lymphocyte transformation via suppression of RelA acetylation, *Cancer Res.* 69 (2009) 583–592.
- [177] J. Zhang, F. Zhang, X. Didelot, et al., Maternal high fat diet during pregnancy and lactation alters hepatic expression of insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring, *BMC Genomics* 10 (2009) 478.
- [178] L.L. Wang, Z. Zhang, Q. Li, et al., Ethanol exposure induces differential microRNA and target gene expression and teratogenic effects which can be suppressed by folic acid supplementation, *Hum. Reprod.* 24 (2009) 562–579.
- [179] P. Parra, F. Serra, A. Palou, Expression of adipose microRNAs is sensitive to dietary conjugated linoleic acid treatment in mice, *PLoS One* 5 (2010) e13005.
- [180] C. Boesch-Saadatmandi, A. Loboda, A.E. Wagner, et al., Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155, *J. Nutr. Biochem.* 22 (2011) 293–299.
- [181] S. Gaedicke, X. Zhang, C. Schmelzer, et al., Vitamin E dependent microRNA regulation in rat liver, *FEBS Lett.* 582 (2008) 3542–3546.
- [182] A. Granjon, M.P. Gustin, J. Rieusset, et al., The microRNA signature in response to insulin reveals its implication in the transcriptional action of insulin in human skeletal muscle and the role of a sterol regulatory element-binding protein-1c/myocyte enhancer factor 2C pathway, *Diabetes* 58 (2009) 2555–2564.
- [183] L. Cheung, C. Gustavsson, G. Norstedt, P. Tollet-Egnell, Sex-different and growth hormone-regulated expression of microRNA in rat liver, *BMC Mol. Biol.* 10 (2009) 13.
- [184] P.D. Gluckman, M.A. Hanson, H.G. Spencer, Predictive adaptive responses and human evolution, *Trends Ecol. Evol.* 20 (2005) 527–533.
- [185] F. Backhed, J.K. Manchester, C.F. Semenkovich, J.I. Gordon, Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 979–984.
- [186] P.J. Turnbaugh, R.E. Ley, M.A. Mahowald, V. Magrini, E.R. Mardis, J.I. Gordon, An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest, *Nature* 444 (2006) 1027–1031.
- [187] F. Backhed, H. Ding, T. Wang, et al., The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 15718–15723.
- [188] J.K. DiBaise, H. Zhang, M.D. Crowell, R. Krajmalnik-Brown, G.A. Decker, B.E. Rittmann, Gut microbiota and its possible relationship with obesity, *Mayo Clin. Proc.* 83 (2008) 460–469.
- [189] A. Groom, C. Potter, D.C. Swan, et al., Postnatal growth and DNA methylation are associated with differential gene expression of the TACSTD2 gene and childhood fat mass, *Diabetes* 61 (2012) 391–400.
- [190] M.D. Niculescu, C.N. Craciunescu, S.H. Zeisel, Dietary choline deficiency alters global and gene-specific DNA methylation in the developing hippocampus of mouse fetal brains, *FASEB J.* 20 (2006) 43–49.
- [191] M.G. Mehedint, C.N. Craciunescu, S.H. Zeisel, Maternal dietary choline deficiency alters angiogenesis in fetal mouse hippocampus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 12834–12839.
- [192] C.N. Craciunescu, A.R. Johnson, S.H. Zeisel, Dietary choline reverses some, but not all, effects of folate deficiency on neurogenesis and apoptosis in fetal mouse brain, *J. Nutr.* 140 (2010) 1162–1166.
- [193] K. Vanhees, S. Coort, E.J. Ruijters, R.W. Godschalk, F.J. van Schooten, S. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, Epigenetics: prenatal exposure to genistein leaves a permanent signature on the hematopoietic lineage, *FASEB J.* 25 (2011) 797–807.
- [194] Y. Ba, H. Yu, F. Liu, et al., Relationship of folate, vitamin B12 and methylation of insulin-like growth factor-II in maternal and cord blood, *Eur. J. Clin. Nutr.* 65 (2011) 480–485.
- [195] C. Hoyo, A.P. Murtha, J.M. Schildkraut, et al., Methylation variation at IGF2 differentially methylated regions and maternal folic acid use before and during pregnancy, *Epigenetics* 6 (2011) 928–936.
- [196] R.S. Strakovsky, X. Zhang, D. Zhou, Y.X. Pan, Gestational high fat diet programs hepatic phosphoenolpyruvate carboxylase gene expression and histone modification in neonatal offspring rats, *J. Physiol.* 589 (2011) 2707–2717.
- [197] X. Liu, J. Wang, R. Li, et al., Maternal dietary protein affects transcriptional regulation of myostatin gene distinctively at weaning and finishing stages in skeletal muscle of Meishan pigs, *Epigenetics* 6 (2011) 899–907.
- [198] S. Zheng, M. Rollet, Y.X. Pan, Maternal protein restriction during pregnancy induces CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP $\beta$ ) expression through the regulation of histone modification at its promoter region in female offspring rat skeletal muscle, *Epigenetics* 6 (2011) 161–170.
- [199] D. Zhou, Y.X. Pan, Gestational low protein diet selectively induces the amino acid response pathway target genes in the liver of offspring rats through transcription factor binding and histone modifications, *Biochim. Biophys. Acta* 1809 (2011) 549–556.
- [200] Q. Fu, R.A. McKnight, X. Yu, L. Wang, C.W. Callaway, R.H. Lane, Uteroplacental insufficiency induces site-specific changes in histone H3 covalent modifications and affects DNA-histone H3 positioning in day 0 IUGR rat liver, *Physiol. Genomics* 20 (2004) 108–116.
- [201] S.E. Pinney, L.J. Jaekle Santos, Y. Han, D.A. Stoffers, R.A. Simmons, Exendin-4 increases histone acetylase activity and reverses epigenetic modifications that silence Pdx1 in the intrauterine growth retarded rat, *Diabetologia* 54 (2011) 2606–2614.
- [202] B. Bao, R. Rodriguez-Melendez, S.S. Wijeratne, J. Zempleni, Biotin regulates the expression of holocarboxylase synthetase in the miR-539 pathway in HEK-293 cells, *J. Nutr.* 140 (2010) 1546–1551.
- [203] G.D. Noratto, G. Angel-Morales, S.T. Talcott, S.U. Mertens-Talcott, Polyphenolics from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) and red muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) protect human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) from glucose- and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and target microRNA-126, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 7999–8012.
- [204] G.D. Noratto, Y. Kim, S.T. Talcott, S.U. Mertens-Talcott, Flavonol-rich fractions of yaupon holly leaves (*Ilex vomitoria*, Aquifoliaceae) induce microRNA-146a and have anti-inflammatory and chemopreventive effects in intestinal myofibroblast CCD-18Co cells, *Fitoterapia* 82 (2011) 557–569.
- [205] Y. Tang, A. Banan, C.B. Forsyth, et al., Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32 (2008) 355–364.
- [206] S. Altmann, E. Murani, M. Schwerin, C.C. Metzges, K. Wimmers, S. Ponsuksili, Somatic cytochrome c (CYCS) gene expression and promoter-specific DNA methylation in a porcine model of prenatal exposure to maternal dietary protein excess and restriction, *Br. J. Nutr.* 107 (2012) 791–799.

## **AGRAÏMENTS**



*Donar les gràcies sembla que ha de ser cosa fàcil, però sovint, quan la gratitud és immensa, no es troben les paraules. Per això més que les gràcies, crec que aquesta última plana és un reconeixement a tots aquells qui d'una manera o altra han fet possible aquesta tesi.*

*Començar pel principi sempre ajuda, així que en primer lloc vull agrair al Dr. Josep Jiménez l'oportunitat de formar part del seu grup, de donar un pas endavant en el meu camí. Amb ell he après moltes de coses, moltes d'elles en clau de ciència, però útils més enllà del laboratori. També he d'agair la seva ajuda al Dr. Ruben Díaz i la Dra. Marta Ramón. Escoltar-los és aprendre.*

*Next I would like to say thank you to Prof. Uwe Tietge. You can not imagine how grateful I feel with you. I'm convinced one of the best things I did during my thesis is to visit your laboratoy, with your funny scientific coffees. As I saidto you so many times, it's a really pity Groningen has no mountains.*

*Also I'm grateful with Dr. Torsten Posch. Probably it's uncountable how many questions I asked you in two months. You helped me with everything, everyday and everywhere. I couldn't have enjoyed so much UMCG without you. Also Gemma, Jean Freak, Arne and Renze. Wonderful people!!!*

*A les endo ladies, ...vaia sols! tinc molta sort d'haver compartit aquests temps amb vosaltres. A la Débora, jejeeje me entra la risa al hacer un repasillo rápido de todas nuestras charlas. Te deseo lo mejor, y estoy convencida que lo conseguirás. A la Sílvia, et cedeixo els ON... tots teus! I també et desitjo la millor de les sorts, quina llàstima que no hi hakis estat des del primer dia. A la Núria, (que també la conto com a endo lady), quants cafés! queda pendent canviar-nos les vides un dia ;). A la Judith, per mi ets com una germana, tot el dia juntes durant durant 5 anys donen per a molt, de fet, després de tanr temps ja m'he acostumat a respondre al teu nom, per aquells qui de tan veure'ns juntes encara no saben qui és qui. Ara se'ns acumularan les coses per explicar-nos, així que ja saps... berenars, berenars!!!!*

*A tots els companys de laboratori, els que hi són (la Sònia, l'Angie, l'Héctor, la Carla i la Eva) i els que hi han estat (la Idoia, la Sandra, la Laia i la Patri) per compartir el dia a dia. A la Raquel, por caminar en paralelo. A la Gemma, per tota l'ajuda aquests últims mesos, parlant amb tu sempre m'emporto alguna idea positiva. Marassa! A la Laura Martínez, que hem compartit poc temps, però ha estat un plaer, i et desitjo el millor en aquesta nova i dolça etapa. A la Loreto i a la Judith, per tots els consells. A la Isabel, por cuidar siempre de mis ratones y por hacer la vista gorda con nosotras, o darnos por imposibles, que es lo mismo.*

*A les bruixes, la Sita, l'Anita, la Mbel i la Míriam. Les millors biòlogues que he conegut mai. Sempre heu estat un referent per mi, el mirall on mirallar-me. Al vostre costat sempre m'he sentit petita, perquè vosaltres sou molt grans!*

*A les 5, la Montserrat, la Sheila, la Lali i l'Olga. I hi afegeixo un sisè, l'Eloi. Sou "casa" i sou les millors. Sou jo, o millor dit jo sóc vosaltres. Encara que vagim agafant camins*

*diferents, n'hi ha prou en trobar-nos de quan en quan per adonar-nos que l'essència no es perd. Us trobo molt a faltar.*

*A la muntanya, per totes les hores que hi passo, i perquè sempre és capaç de fer-me canviar el punt de mira quan d'alguna cosa no me'n surto. I als amics de la muntanya. En especial a la "familieta de la muntanya", la Heura, Xavi i la princess. Hi heu estat quan més us he necessitat i hi heu estat quan millor m'ho he passat. Seguim fent plans?!?*

*A la família de Llanars, el Francesc, la Mercè, el Bernat i la Sara. Amb vosaltres he fet molta sort!!!! Moltes gràcies per tot!*

*Als de casa, als meus pares perquè m'ho han donat tot. Sense vosaltres no hauria arribat on sóc. A la ieia, i al ieio, per voler endolcir la vida dels meus ratolins amb caramels, i per creure sempre que allò que remenava per Barcelona era alguna cosa important. I a les meves germanes, que són la millor del món mundial!!!! A tota hora disponibles per aguantar qualsevol rotllo. Us dedico a vosaltres la meua feina de quatre anys, perquè si hagués de triar dos persones clau en aquest període serieu vosaltres. Així que tot el meu esforç va per vosaltres, i per l'Àlex (perquè si m'haguessin fet triar un cunyat no n'hauria torbat cap altre de millor!!), la Bruna i Rode!!!!*

*I per últim, el més important, el Roger. Déu n'hi do la de rotllos que t'he soltat sobre si l'expressió d'aquell gen puja mentre la secreció d'aquella proteïna baixa, o si he pensat que puc fer aquell experiment perquè aquell altre no em convenç... Com has aguantat jajaja ets un campió!!! Saps que aquesta tesi és dels dos, com tot! per això em fa tanta il·lusió el final d'aquesta etapa, perquè sé que tot el que vindrà també serà dels dos. Gràcies per compartir el camí.*

*Gràcies a tots!*