



# UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

## SOBREPESO Y ALTERACIONES EN LA GRASA VISCERAL DEL RATÓN ADULTO, GENERADO POR ESTRÉS POST NATAL TEMPRANO

**LIZA FONSECA ROA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales.

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : MIGUEL LLANOS SILVA	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: MARCO GALLEGUILLOS	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: ANDRÓNICO NEIRA	.....	.....

SANTIAGO, CHILE  
2011

## ÍNDICE

Agradecimientos .....	2
Resumen .....	3
Abstract .....	4
1. INTRODUCCIÓN .....	5
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	7
3. HIPÓTESIS .....	13
4. OBJETIVO GENERAL .....	13
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
6.1. Modelo animal .....	14
6.2. Condiciones ambientales y dieta .....	14
6.3. Procedimientos y determinaciones en animales vivos .....	14
6.4. Procedimientos y determinaciones en animales sacrificados .....	17
6.4.1. Determinaciones en panículo adiposo epididimal (PAE) .....	17
6.4.1.1. Análisis de RT-PCR de CB <sub>1</sub> R y adipofilina .....	17
6.4.1.2. Análisis de Western blot de CB <sub>1</sub> R y adipofilina .....	19
6.4.1.3. Análisis de actividad enzimática de LPL y FAAH .....	22
6.4.2. Determinaciones de niveles plasmáticos de ir-CTT, leptina y Adiponectina .....	23
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	24
8. RESULTADOS .....	25
8.1. Determinaciones en animales vivos Control y Estrés (día 1-160) .....	25
8.1.1. Ganancia de peso corporal (día 1-160) .....	25
8.1.2. Ingesta alimentaria (día 30-160) .....	25
8.1.3. Tolerancia a la glucosa (día 150) .....	26
8.2. Determinaciones en animales sacrificados Control y Estrés (día 160) .....	27
8.2.1. Determinaciones en panículo adiposo epididimal (PAE) .....	27
8.2.1.1. Peso del PAE .....	27
8.2.1.2. Análisis de RT-PCR y Western blot de CB <sub>1</sub> R y adipofilina .....	27
8.2.1.3. Actividad enzimática de LPL y FAAH .....	30
8.2.2. Determinaciones de niveles plasmáticos .....	31
8.2.2.1. Corticosterona inmunoreactiva (ir-CTT) .....	31
8.2.2.2. Leptina .....	32
8.2.2.3. Adiponectina .....	33
9. DISCUSIÓN .....	35
10. CONCLUSIÓN .....	42
11. BIBLIOGRAFÍA .....	43

## **AGRADECIMIENTOS**

FONDECYT 1070663/1100145.

Valeska Castillo T.

Carolina Aguirre P.

Paulo Silva O.

Miguel Llanos S.

Nibaldo Ávila M.

## RESUMEN

El estrés nociceptivo (NS) en ratones macho durante la lactancia, genera alteraciones metabólicas que se manifiestan en el estado adulto. El objetivo de este estudio fue determinar si algunas de dichas alteraciones que involucran al tejido adiposo epididimal están asociadas a una hiperactivación del Sistema Endocanabinoide (SEC). Al respecto, una parte fundamental del SEC lo constituyen los receptores tipo 1 para canabinoides/endocannabinoides (CB<sub>1</sub>R), su ligando endógeno Anandamida (ADA) y la enzima que degrada a ADA, la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH).

Doce horas posterior al nacimiento, crías macho de ratones de la cepa CD-1, de semejante tamaño de camada y peso corporal (PC), conformaron 2 grupos: Control (C) y Estrés (E), recibiendo ambos lactancia cruzada al azar. Durante la lactancia, el grupo E recibió diariamente una inyección subcutánea de suero fisiológico y ambos grupos se sometieron a un control diario de PC. A partir del día 30, el PC se evaluó cada 10 días en conjunto con la ingesta de alimento; ambos parámetros no mostraron diferencias significativas entre C y E, al igual que una prueba de tolerancia a la glucosa realizada a los 150 días de edad. Posteriormente, animales de 160 días fueron sacrificados para extraer sangre y panículo adiposo epididimal (PAE). Las concentraciones plasmáticas de corticosterona inmunoreactiva (ir-CTT), leptina y adiponectina se determinaron mediante ensayos de ELISA comerciales. En el PAE, se analizó la expresión de CB<sub>1</sub>R y adipofilina mediante RT-PCR y Western Blot, además de la actividad enzimática de la FAAH mediante su capacidad de hidrolizar ADA radioactiva y la actividad de la lipasa lipoproteica (LPL) mediante espectrofluorimetría utilizando un sustrato sintético. Los resultados mostraron cantidades significativamente mayores de grasa epididimal, ir-CTT, leptina y expresión proteica de CB<sub>1</sub>R y adipofilina en el grupo E. Contrariamente, la actividad de la FAAH como los niveles de adiponectina son significativamente menores en este grupo. No hubo diferencias significativas en la LPL (sólo tendencia a ser mayor en el grupo E), ni en la expresión de mRNA para CB<sub>1</sub>R y adipofilina. La mayor acumulación de grasa epididimal en el grupo E adulto, sugiere una reprogramación disfuncional de dicho tejido causada por el NS, reforzado a largo plazo por los niveles aumentados de leptina plasmática y molecularmente evidenciada por una hiperactividad de CB<sub>1</sub>R, debido a la acción concertada de su mayor expresión proteica con la menor actividad de la FAAH.

## **ABSTRACT**

Male mice pups subjected to a soft nociceptive stress (NS) during lactation show metabolic disruptions during adulthood. The aim of this study was related to determine whether some of these alterations manifested in the epididymal fat tissue (EFT) are associated to a hyperactivated Endocannabinoid System (ECS). In this regard, some key components of the ECS are cannabinoids/endocannabinoids receptors type 1 (CB<sub>1</sub>R), the endogenous ligand anandamide (ADA) and the ADA hydrolyzing enzyme named Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH).

Twelve hours after birth, CD-1 male mice pups, coming from a similar litter size and showing similar body weights (BW) were divided in two groups: Control (C) and Stress (S). After randomization both groups were cross-fostered with substitute dams. During lactation S group was daily subcutaneously injected with a saline solution in the back, and both groups were subjected to a daily body weight control. From day 30, BW was evaluated every ten days together with the amount of food intake; being both parameters not significantly different in S and C groups. In addition, a glucose tolerance test performed to 150 days old animals did not show differences between S and C mice. Subsequently, 160d old mice were sacrificed to extract blood and EFT. Immunoreactive corticosterone (ir-CTT), leptin and adiponectin plasma levels were measured by commercial ELISA assays. Epididymal fat Adipophilin and CB<sub>1</sub>R expression was determined by RT-PCR and Western Blot analysis. In addition, FAAH enzymatic activity was evaluated by its ability to hydrolyze radioactive ADA. Lipoprotein lipase activity (LPL) in the EFT was determined by spectrofluorimetry after hydrolysis of a synthetic substrate. Results show significantly higher amounts of EFT, higher levels of circulating ir-CTT and leptin, together with CB<sub>1</sub>R and adipophylin protein expression in EFT of S mice. Conversely, FAAH activities from EFT and adiponectin plasma levels are significantly decreased in this group. No significant differences in LPL activity (even slightly higher in S mice) and similar CB<sub>1</sub>R and adipophilin mRNA expression levels were found in EFT. Epididymal fat accumulation in adult S mice suggests a dysfunctional reprogramming in such a tissue due to the early NS, which may result long term reinforced by the higher plasma levels of leptin and molecularly evidenced by CB<sub>1</sub>R overactivity, resulting from a concerted action of its higher protein expression and a lower FAAH activity.

## 1. INTRODUCCIÓN

El aumento de sobrepeso/obesidad (S/O) que ha afectado a la población humana en los últimos años, es uno de los temas que ha generado mayor preocupación y estudios. Al respecto, se ha planteado que el desarrollo de S/O y trastornos metabólicos asociados en el estado adulto, tienen su origen durante períodos críticos del desarrollo de tejidos y órganos como lo es el período fetal / neonatal. Estas observaciones se han complementado con el desarrollo de diversos modelos animales para el estudio de los orígenes tempranos de dichas condiciones, particularmente aquellas relacionados con alteraciones medioambientales vinculadas a nutrición y estrés durante la vida intrauterina y/o neonatal. En las últimas décadas, un área que ha tenido preponderancia en el estudio de S/O la constituye el sistema endocanabinoide (SEC), presente en el sistema nervioso central (SNC) y en diversos tejidos periféricos involucrados en la homeostasis de energía. De esta forma en nuestro laboratorio se pretende establecer la relación entre estrés postnatal temprano y una disfunción tardía del SEC en diversos órganos periféricos, como causa de una condición metabólica indeseable conducente a diversas patologías.

Debido a que en el SNC existe una interacción funcional entre las neuronas que responden a estímulos estresantes y el SEC, en este estudio se pretendió evaluar si la aplicación de un suave estrés nociceptivo durante la lactancia en roedores machos genéticamente no susceptibles a desarrollar S/O, era capaz de provocar alteraciones en la regulación del SEC presente en un tejido periférico como lo es el pániculo adiposo epididimal (PAE). Las consecuencias metabólicas que podrían tener estas alteraciones, en conjunto con otras asociadas al SEC presente en otros tejidos involucrados en la homeostasis de energía, pueden ser variadas, impactando directamente en el estado funcional de los organismos animales. Dicho impacto podría manifestarse con la presentación global del síndrome metabólico o bien, de alguno de sus componentes en forma aislada como por ejemplo S/O, hipertensión, resistencia a insulina o dislipidemia, como también con la presentación de diabetes mellitus tipo 2, entre otras.

Bajo estas circunstancias, animales estresados durante la lactancia se evaluaron en el estado adulto para observar posibles alteraciones en peso corporal (PC), ingesta alimentaria y tolerancia a la glucosa. Posteriormente, en animales sacrificados a los 160 días se evaluó en el PAE: peso del PAE, expresión de mRNA y proteica del receptor para

canabinoides/endocannabinoides (CB<sub>1</sub>R) y adipofilina. Se evaluó también la actividad enzimática de la lipasa lipoproteica de superficie (LPL) y de la enzima que degrada endocannabinoides, la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). Además se evaluaron los niveles plasmáticos de corticosterona inmunoreactiva (ir-CTT), leptina y adiponectina.

Los resultados aportarán antecedentes sobre los efectos a largo plazo que provoca el enfrentarse a estímulos ambientales postnatales estresantes, particularmente aquellos que afectan la funcionalidad del SEC de un tejido periférico, con consecuencias patológicas sistémicas.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En los últimos años, muchos estudios han sugerido que una alteración de la homeostasis en períodos críticos de desarrollo de tejidos y órganos, lleva a presentar patologías en el estado adulto, así por ejemplo, estudios epidemiológicos en humanos mostraron una relación inversa entre el peso corporal (PC) al nacer y al año de edad, y el riesgo de desarrollar ciertas patologías crónicas en la adultez, como diabetes, hipertensión y enfermedad coronaria (Barker y Osmond, 1986). Así, el sobrepeso/obesidad (S/O) podría ser programable en la vida temprana, ya que factores ambientales adversos durante este período causan una alteración en el crecimiento y desarrollo normal, generándose un fenotipo adulto más susceptible de desarrollar estas patologías (Barker, 1995). De esta forma, la interacción de factores ambientales estresantes durante el período postnatal temprano, como a los que podría estar expuesto un recién nacido prematuro o un recién nacido que haya experimentado algún desbalance hormonal del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) durante el desarrollo intrauterino, podrían desarrollar S/O o algún trastorno metabólico en la vida adulta.

Estos estudios nos relacionan con el concepto de “reprogramación”, la cual ha sido definida como “inducción, supresión, o desarrollo deficiente permanente de estructuras somáticas por un estímulo temprano o insulto ocurrido en un período crítico, resultando en consecuencias funcionales a largo plazo” (Lukas, 1991).

Se han empleado modelos animales, fundamentalmente roedores para realizar estudios sobre como la aplicación de estrés en períodos críticos de desarrollo, como lo es la lactancia, puede llegar a generar consecuencias fisiopatológicas durante toda la vida. Es así como ratones genéticamente no susceptibles a desarrollar S/O, sometidos a un suave estrés nociceptivo (NS) durante la lactancia, presentan sobrepeso en la adultez, junto a una perturbación en los niveles de glucosa, insulina, lípidos, leptina, corticosterona y hormona adrenocorticotrófica (ACTH). Se observó también aumento de peso de la grasa epididimal con hipertrofia de adipocitos en animales estresados en comparación con los controles sin estrés y el aumento de PC ocurrió en presencia de un pequeño aumento en la ingesta de alimentos, sin disminución de la actividad locomotora espontánea, indicando que en estos animales la eficiencia calórica en la adultez es mayor (Loizzo *et al.*, 2006).

En la última década, estudios relacionados con S/O en humanos y en modelos animales, han aportado datos respecto a que esta condición podría deberse a una disfunción hormonal global, entre las cuales el sistema endocanabinoide (SEC) se vería afectado, desarrollándose particularmente una hiperactivación de éste (Van Gaal *et al.*, 2005). En general los componentes del SEC son: los cannabinoides endógenos o endocannabinoides (EC), las enzimas que contribuyen a su síntesis e hidrólisis y los receptores que los ligan para mediar su actividad biológica a nivel celular (Giuffrida *et al.*, 2001).

Efectuando un análisis de los componentes del SEC, se han descrito receptores de membrana para EC, entre los cuales se han identificado y clonado el receptor canabinoide/endocanabinoide tipo 1 (CB<sub>1</sub>R) y el receptor canabinoide/endocanabinoide tipo 2 (CB<sub>2</sub>R) (Matsuda *et al.*, 1990). Se han logrado identificar CB<sub>1</sub>R y CB<sub>2</sub>R funcionales en distintas células del organismo, así, se ha identificado la presencia de CB<sub>1</sub>R en células del sistema gastrointestinal (Pinto. *et al.*, 2002), hígado (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005), páncreas (Matias *et al.*, 2006), músculo (Pagotto *et al.*, 2006), adipocitos (Cota *et al.*, 2003) y cerebro donde los CB<sub>1</sub>R se expresan en varias regiones, incluyendo el ganglio basal, hipocampo, sistema límbico, corteza e hipotálamo. En el sistema límbico, se expresan en regiones como el núcleo accumbens, que controla el impacto motivacional de los alimentos, generando gratificación hacia el consumo de éstos. En hipotálamo se expresan en los núcleos que controlan el apetito y la ingesta de alimentos, como el paraventricular, ventromedial y área hipotalámica lateral (Moldrich y Wenger, 2000). Los CB<sub>2</sub>R se expresan principalmente en células del sistema inmune (Baker *et al.*, 2006) y en bajos niveles en cerebro (Gong., *et al.* 2006). Ambos receptores han sido selectivamente antagonizados, logrando revertir los parámetros metabólicos modificados por una alteración en la regulación del SEC. Además, la identificación y clonación de CB<sub>1</sub>R y su posterior utilización para la creación de sus agonistas y antagonistas, junto al desarrollo de ratones transgénicos deficientes de CB<sub>1</sub>R (knockout/CB<sub>1</sub> o CB<sub>1</sub><sup>-/-</sup>), permitió demostrar, entre otros estudios, que son estos receptores los responsables de las acciones inductoras del apetito causadas por el Tetrahidrocanabinol (THC) y de los efectos análogos de los EC (Kirkham *et al.*, 2002).

Los EC son compuestos derivados de ácidos grasos no saturados, de los cuales los más estudiados son el araquidonil etanolamida o anandamida (ADA) (Devane *et al.*, 1992)

y el 2-araquidonil glicerol (2-AG) (Sugiura *et al.*, 1995). La formación de ADA se realiza a partir de fosfolípidos de membrana como la fosfatidiletanolamina, que se conjuga con ácido araquidónico, por acción de la N-aciltransferasa (NAT), para formar N-araquidonilfosfatidiletanolamina (NAPE), que gracias a la acción de una fosfolipasa D N-acil-fosfatidil-etanolamina-selectiva (PLD-NAPE), formará finalmente ADA más ácido fosfatídico (Cadas *et al.*, 1997). La formación de 2-AG parte desde fosfatidilinositol, que por acción de fosfolipasa C formará 1,2 diacilglicerol, más la acción de diacilglicerol lipasa (DAGL), formará 2-AG. También puede formarse partiendo desde fosfatidilinositol, que con acción de fosfolipasa A1 formará 2-araquidonil-lisofosfatidilinositol (lyso-PI), más lisofosfolipasa C, formará 2-AG (Piomelli, 2003).

Además de las enzimas que catalizan la biosíntesis de EC, existen las enzimas que los degradan, siendo particularmente importante la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), que genera etanolamina más ácido araquidónico a partir de ADA (Deutsch *et al.*, 2002), y la monoacilglicerol lipasa que degrada 2-AG en ácido araquidónico más glicerol (Di Marzo, 2006).

La participación del SEC como uno de los sistemas interrelacionados en el hipotálamo para integrar una respuesta central y periférica asociada a la ingesta de alimentos, homeostasis de energía y regulación de la grasa corporal (Di Marzo y Matias, 2005; Cota *et al.*, 2003), ha podido ser estudiada en parte gracias a la identificación y clonación de CB<sub>1</sub>R, lo que ha permitido la realización de estudios sobre sus antagonistas y agonistas selectivos. La participación de CB<sub>1</sub>R en S/O y sus alteraciones metabólicas asociadas, han podido ser revertidas por tratamientos con antagonistas de dichos receptores, entre los cuales el más utilizado, tanto en humanos como en modelos animales es el SR141716A (Bensaid *et al.*, 2003; Van Gaal *et al.*, 2005).

Diversos son los estudios que avalan una interacción funcional entre el SEC y el eje hipotálamo pituitaria adrenal (HPA), donde los glucocorticoides (GCs) son capaces de modular algunos componentes del SEC, así, una inyección de GCs en hipotálamo es capaz de liberar EC, lo que podría explicar los efectos rápidos de GCs sobre la ingesta alimentaria (Di Marzo y Matías, 2005). Otro ejemplo de la interacción entre SEC y HPA se observó con la administración de un agonista CB<sub>1</sub> a terneros, lo que produjo hipoalgesia, aumento del cortisol y aumento de la frecuencia respiratoria, respuestas semejantes a las producidas

por estrés (Zenor *et al.*, 1999). Por otra parte el aumento de mRNA para CB<sub>1</sub>R en cerebro de cerdos, posterior a la exposición a un agente estresante (Weesner y Malven, 1996), la regulación por hidrocortisona de CB<sub>1</sub>R en células alveolares tipo 2 de rata (Rice *et al.*, 1997) y el aumento de la concentración de 2-AG en amígdala de rata por tratamientos crónicos con corticosterona (Hill *et al.*, 2005), son antecedentes adicionales que sugieren esta interacción.

La participación del SEC sobre el balance energético ocurre tanto a nivel central, como periférico, regulando la lipogénesis tanto en hígado como en tejido adiposo (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005; Cota *et al.*, 2003).

En SNC, los receptores CB<sub>1</sub> están localizados principalmente a nivel presináptico, lo que permite la acción retrógrada de los EC en la señalización interneuronal, afectando la expresión de mediadores orexígenos y anorexígenos en hipotálamo (Di Marzo y Matías, 2005). También se ha observado que los CB<sub>1</sub>R se activan después de un período de ayuno e inducen la ingesta de alimento (Di marzo *et al.*, 2001). Es así como los niveles de EC hipotalámicos son altos durante la deprivación y bajos durante el consumo de alimentos (Kirkham *et al.*, 2002). La presencia de CB<sub>1</sub>R en diversos tejidos ha sido demostrada en parte por el uso de su antagonista selectivo, el Rimonabant (SR141716A), el cual ha disminuido la masa grasa en relación a la magra y ha mejorado los parámetros metabólicos como insulina, leptina y colesterol en modelos de obesidad inducida por dieta (Ravinet Trillou *et al.*, 2003).

A nivel periférico, una alteración en la regulación del SEC debido a una dieta alta en grasa, rica en ácidos grasos poliinsaturados (precursores de la síntesis de EC), estimula la producción de ADA, estimula la expresión de CB<sub>1</sub>R y disminuye la actividad de la FAAH, estimulándose en hígado la expresión de factores de transcripción lipogénicos (SREBP) y las enzimas lipogénicas acetil CoA carboxilasa 1 (ACC1) y la sintetasa de ácidos grasos (FAS) y a nivel de tejido adiposo la estimulación de la actividad de Lipasa lipoproteica (LPL) (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005; Cota *et al.*, 2003).

Si bien la obesidad es caracterizada por la acumulación de lípidos en todas las células del cuerpo, en adipocitos presenta una marcada hipertrofia e hiperplasia (de Ferranti y Mozaffarian., 2008), donde además de su rol en el almacenamiento de lípidos, el tejido

adiposo funciona como órgano endocrino (Frühbeck *et al.*, 2001), produciendo una amplia gama de adipocinas, las que también han sido objeto de estudio en la regulación del SEC.

Existen estudios donde se ha considerado al ayuno como una alteración de la homeostasis que provocará una elevación transiente en los niveles de EC hipotalámicos y del sistema límbico y la activación de CB<sub>1</sub>R que estimularán la ingesta de alimento (Kirkham *et al.*, 2002), lo que ha relacionado al SEC con la hormona leptina, proteína de 16 kDa (Halaas *et al.*, 1995) que se expresa en tejido adiposo (Zhang *et al.*, 1994) y en menor proporción en estómago y placenta (Masuzaki *et al.*, 1997), cuyos niveles plasmáticos están correlacionados positivamente con la grasa corporal y son altos en condición de obesidad (Maffei *et al.*, 1995; Considine *et al.*, 1996). Respecto a su participación en el SEC se ha demostrado que la elevación de los niveles hipotalámicos de EC están inversamente correlacionados con los niveles sanguíneos de leptina, cuyos niveles aumentan después del consumo de alimentos, reduciendo la síntesis de ADA y 2-AG en el hipotálamo (Di Marzo *et al.*, 2001). Se sabe además, que ratones obesos con señalización defectuosa de leptina presentan altos niveles de EC hipotalámicos y que el aumento de éstos a nivel hipotalámico se debería a una disminución en los niveles de leptina (Di Marzo *et al.*, 2001). Además ADA y 2-AG disminuyen al estimular con leptina (Matias y Di Marzo, 2006).

Otra adipocina que resulta alterada en su síntesis y expresión por una alteración en la regulación del SEC es la adiponectina, la cual es inhibida luego de una estimulación de los CB<sub>1</sub>R (Bensaid *et al.*, 2003). La adiponectina es una proteína plasmática sintetizada y secretada en tejido adiposo y que tiene un rol en la reducción de la expresión de enzimas involucradas en lipogénesis, capaz de inducir la oxidación de ácidos grasos libres en músculo y la reducción de PC en ratones (Freubis *et al.*, 2001). Se sabe además que los niveles sanguíneos de adiponectina disminuyen en obesidad (Weyer *et al.*, 2001). En su relación con el SEC se ha demostrado en ratas y cultivos de adipocitos, que el bloqueo de CB<sub>1</sub>R con SR141716A origina un aumento en la expresión y concentraciones plasmáticas de adiponectina (Bensaid *et al.*, 2003). En otro estudio realizado en humanos, con 82 sujetos obesos y magros no se encontró ninguna asociación entre expresión de mRNA para CB<sub>1</sub>R y adiponectina, tampoco para su secreción en tejido adiposo ni niveles circulantes (Lofgren *et al.*, 2007).

La expresión de receptores CB<sub>1</sub> en tejido adiposo ha permitido realizar estudios de comparación con ratones CB<sub>1</sub><sup>-/-</sup>. Estos últimos son más livianos, más delgados y con menos masa grasa y más masa magra que CB<sub>1</sub><sup>+/+</sup>, lo que sugiere que el SEC contribuye tónicamente a la acumulación de grasa, independiente de la ingesta de alimento y actuando directamente sobre el tejido adiposo (Cota *et al.*, 2003). En otro estudio ratones CB<sub>1</sub><sup>-/-</sup> con dieta alta en grasa no desarrollaron obesidad o insulino-resistencia con modelos de alimentación pareada (Ravinet Trillou *et al.*, 2004). Existe expresión de mRNA para CB<sub>1</sub>R en grasa epididimaria, lo que indica la presencia de receptores activos para ADA y 2-AG, expresión que también existe en cultivos primarios de adipocitos, los que al ser estimulados con un agonista CB<sub>1</sub> (WIN-55,212) aumentaron en forma dosis-dependiente la actividad de la LPL, lo que podría promover la captación de grasa por parte de los adipocitos, siendo este efecto bloqueado por el tratamiento con SR141716A, demostrando que dicho efecto es mediado por CB<sub>1</sub>R (Cota *et al.*, 2003). Estudios complementarios en líneas celulares de adipocitos de ratón muestran que un aumento en los niveles de EC precede la diferenciación a adipocitos maduros y que la estimulación crónica de CB<sub>1</sub>R durante esta diferenciación, acelera la aparición de un marcador temprano de diferenciación, el receptor activado por proliferadores peroxisomales-  $\gamma$  (PPAR-  $\gamma$ ), junto con inducir la acumulación de gotas de grasa (Matías *et al.*, 2006). Por otra parte el bloqueo de CB<sub>1</sub>R en dichas líneas celulares de adipocitos con su antagonista selectivo impide su proliferación (Gary-Bobo *et al.*, 2006).

Existe además un marcador de acumulación lipídica llamado adipofilina, que se encontraría aumentado al estimular a los CB<sub>1</sub>R, esta proteína de 50 kDa que se encuentra en adipocitos, está asociada a depósitos de lípidos en células almacenadoras o sintetizadoras de grasa (Heid *et al.*, 1998).

En esta memoria se pretende demostrar que la aplicación de estrés post natal temprano en ratones macho, conduce a alteraciones en el tejido adiposo epididimal en el estado adulto a causa de una hiperactivación del SEC mediada por un proceso de reprogramación disfuncional del tejido.

### **3. HIPÓTESIS**

La aplicación de estrés post natal temprano, genera una alteración en la expresión de receptores CB<sub>1</sub>, con efectos lipogénicos en tejido adiposo, que conducen a la presentación de S/O en ratones adultos.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los efectos de la aplicación de un suave estrés nociceptivo durante la lactancia, en la ganancia de peso corporal y características de la grasa visceral (panículo adiposo epididimal), en relación a la presencia de receptores CB<sub>1</sub> para endocannabinoides en ratones machos adultos.

### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **5.1. Determinar en animales vivos Control y Estrés (día 1-160):**

Ganancia de PC, Ingesta alimentaria (día 30-160) y Tolerancia a la glucosa (día 150).

#### **5.2. Determinar en animales adultos sacrificados Control y Estrés (día 160):**

**5.2.1. En panículo adiposo epididimal (PAE):** Peso del PAE, expresión de mRNA y proteica para CB<sub>1</sub>R y adipofilina, actividad enzimática de lipasa lipoproteica de superficie (LPL) y amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH).

**5.2.2. Determinar niveles plasmáticos de:** Corticosterona inmunoreactiva (ir-CTT), Leptina y Adiponectina.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Nutrición y Regulación Metabólica del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (I.N.T.A) de la Universidad de Chile. Los procedimientos realizados fueron previamente aprobados por el Comité de Bioética para la experimentación en animales del INTA.

### **6.1. Modelo animal**

Ratones de la cepa CD 1 (Charles River).

### **6.2. Condiciones ambientales y dieta**

La temperatura a la que estuvieron sometidos los animales durante el estudio fue entre 20 y 24 °C, con períodos alternantes de luz-oscuridad de 12 horas (luz se encendió a las 7:00 y se apagó a las 19:00 horas). Los animales tuvieron libre acceso a agua potable purificada y alimento.

La dieta que consumieron las madres y las crías al destete fue en base a 4 Kcal/g equivalente a 2,8 Kcal/g asimilable (Champion S.A.), cuya composición en base a cereales, proteína vegetal (soya), proteína animal (pescado y vacuno), trigo, forraje, vitaminas y minerales aportó 21 % de proteína, 4,5 % de grasas totales, 6,4 % de ceniza, 3,8 % de fibra cruda, 55,8 % de energía no nitrogenada y 8 % de humedad. Los experimentos fueron realizados en invierno para evitar las interferencias estacionales en la fisiología animal.

### **6.3. Procedimientos y determinaciones en animales vivos Control y Estrés (día 1-160):**

Un grupo de 10 hembras gestantes de la cepa CD 1 se observaron desde el día 15 de gestación dos veces al día (9:00 y 17:00 horas) para detectar la presencia de crías, de las cuales sólo se utilizaron las crías macho para nuestro estudio.

**Día 1:** Nacimiento de las crías.

Luego de 12 horas desde el momento del nacimiento se seleccionó a las hembras con camadas de un mínimo de 12 crías. Las camadas que nacieron en horarios similares se seleccionaron por sexo, eligiendo a los machos de semejante PC para separarlos aleatoriamente en dos grupos, el grupo Control y el grupo Estrés, cada uno constituido por 18 ratones. Las crías machos en número de 6, quedaron distribuidas aleatoriamente con una madre nodriza para recibir lactancia cruzada.

**Día 1 – 21:** Grupo Estrés.

Ratones sometidos a un suave estrés nociceptivo durante la lactancia: Las crías fueron separadas de sus madres diariamente para proceder a pesarlas. Luego se les inyectó en el dorso 1  $\mu$ L/g de suero fisiológico vía subcutánea con una jeringa (aguja 25G). Transcurridos 10 minutos desde la separación de la madre, se devolvieron a su jaula. Se sacaron de sus jaulas junto a sus madres dos veces por semana para el cambio a una jaula limpia.

**Día 1 – 21:** Grupo Control.

Crías sin estrés, sólo se separaron de sus madres por 10 minutos para ser pesados diariamente durante los 21 días de lactancia y se sacaron de sus jaulas junto a sus madres dos veces por semana para el cambio a una jaula limpia.

**Día 21:** Destete Grupo Control y Estrés.

**Día 22 – 160:** Control de PC e ingesta diaria, medida en intervalos de 10 días, en ambos grupos.

Los animales se evaluaron cada 10 días para conocer su PC y realizar un control de ingesta diaria. La ingesta diaria se corrigió midiendo la pérdida de alimento en jaula en 24 horas. Se cambiaron a jaulas limpias 2 veces por semana.

**Día 150:** Se realiza una prueba de tolerancia a la glucosa a 6 animales de ambos grupos experimentales.

Los animales fueron sometidos a un ayuno previo de 6 horas, posteriormente fueron inyectados con 1,5 mg de glucosa 50% por cada gramo de PC vía intraperitoneal. El volumen total a inyectar fue de 200  $\mu\text{L}$ , donde según el PC de cada ratón se completó con una solución tampón de PBS. La sangre, obtenida por un leve corte en la región más distal de la cola del animal, fue colectada a tiempo 0, para evaluar los niveles basales de glicemia y posteriormente a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos luego de la inyección de glucosa. Los niveles de glucosa sanguínea fueron determinados usando el glucómetro ACCU-CHEK Performa (Roche Diagnostics, Alemania). El rango de medición de este sistema es de 10-600 mg/dl, pudiendo utilizar un volumen de muestra tan pequeño como 0,6  $\mu\text{L}$ ; la duración del ensayo fue de 5-10 segundos por cada animal.

**Día 160:** Sacrificio y toma de muestras de ambos grupos experimentales.

Los animales fueron sacrificados mediante sobredosis anestésica con tiopental sódico (10 mg totales IP), seguido de la extracción de una muestra de sangre (0,5 - 1 ml) desde la vena cava inferior, en animales sin ayuno para mediciones de corticosterona inmunoreactiva (ir-CTT) y con ayuno de 6 horas para el resto de las mediciones, las muestras de sangre fueron recibidas en tubos “vacutainer” con EDTA 0,5 M a 4° C, para ser después centrifugadas a 800 x g a 4° C por 15 minutos. El sobrenadante se aspiró y se almacenó en criotubos a -80° C hasta su posterior análisis. Además se extrajo la totalidad del pániculo adiposo epididimal de ambos grupos de animales, este se pesó por separado y se depositó rápidamente en Nitrógeno líquido para luego ser almacenado a - 80° C hasta su análisis.

## **6.4. Procedimientos y determinaciones en animales adultos sacrificados Control y Estrés (día 160):**

### **6.4.1. Determinaciones en panículo adiposo epididimal (PAE)**

Posterior al análisis de los pesos del PAE en ambos grupos de animales, se realizaron mediciones de expresión de mRNA y proteica para CB<sub>1</sub>R y adipofilina mediante análisis de RT-PCR y de Western Blot. También se realizaron mediciones de actividad enzimática de la LPL de superficie mediante el kit comercial Confluolip y mediciones de actividad enzimática de la FAAH mediante su capacidad para hidrolizar ADA radiactiva.

#### **6.4.1.1. Análisis de RT-PCR de CB<sub>1</sub>R y adipofilina**

La reacción se realizó a partir de tejido pulverizado, utilizando reactivo Trizol (100 mg tejido/ml reactivo). Se prepararon las muestras y se realizó la síntesis del cDNA utilizando la enzima M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (Promega Corporation, USA). Se cuantificó el producto obtenido, midiendo su absorbancia a 260 nm.

La amplificación se llevó a cabo utilizando los siguientes partidores específicos para el receptor CB<sub>1</sub> para endocannabinoides y adipofilina en grasa epididimal, creados mediante el programa computacional vector NTI.

CB<sub>1</sub> R Fw 5`- GGT TCT GAT CCT GGT GGT GTT GAT- 3`

CB<sub>1</sub> R Rev 5`- CCG ATG AGA CAA CAG ACT TCT - 3`

Adipofilina Fw 5`- CGGGGCAGTCAAGCGATATT- 3`

Adipofilina Rev 5`- ATGGGCAGGGCACTTGTCAT- 3`

En ambos casos se usó  $\beta$ -actina como control interno, mediante el factor de corrección de productos PCR ( $\beta$ -actina/CB<sub>1</sub> R) o ( $\beta$ -actina/Adipofilina) cuyos partidores son:

Fw 5`- TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAC - 3`

Rev 5`- TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCCG - 3`

El protocolo específico que se utilizó para el análisis de RT-PCR fue el siguiente:

### Extracción del RNA

Se homogeneizó el tejido con reactivo Trizol (100 mg tejido/ml reactivo) y se incubó el homogeneizado a temperatura ambiente por 10 minutos. Se agregó 200  $\mu$ L de cloroformo RNAsa “free” y se agitó el tubo mediante inversión y luego con vórtex por 15 segundos. Se incubó nuevamente a temperatura ambiente por 10 minutos. La centrifugación se realizó a 12.000 x g por 15 minutos a 4° C y se traspasó la fase superior transparente a un nuevo tubo de 2 ml. Se agregó un volumen de isopropanol, se agitó y se dejó a -20° C toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 12.000 x g por 10 minutos a 4° C y se eliminó el sobrenadante. Se lavó con 1 ml de etanol 75% frío y se centrifugó a 7.500 x g por 7 minutos a 4° C. Luego se eliminó el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente hasta visualizar un pellet transparente. Se agregó al pellet 40  $\mu$ L de agua DEPC (dietilpirocarbonato) y se resuspendió por algunos minutos. Finalmente se almacenó la muestra a -80° C para su posterior análisis.

Para validar la calidad del RNA extraído, éste fue sometido a un gel de electroforesis y visualizado bajo luz ultravioleta.

### Preparación de las muestras una vez obtenido el RNA

Se mezcló 6  $\mu$ L de agua DNAsa/RNAsa free, 9  $\mu$ L de formamida, 3  $\mu$ L de formaldehído 37%, 2  $\mu$ L de MOPS 10X (3-(N-morpholino) propane sulfonic acid), 0,5  $\mu$ L de BrEt 10% y 4  $\mu$ L de RNA. La muestra se mantuvo por 15 minutos a 65° C. Luego se agregó 3  $\mu$ L de la solución tampón de carga y se procedió a cargar el gel (27,5  $\mu$ L ). Para calcular la concentración de RNA se midió su absorbancia a 260 nm de diluciones 1:100.

### Síntesis de cDNA

En un tubo de 0,2 ml se mezcló 1  $\mu$ L de oligo dT, 1 ug/ $\mu$ l de RNA y 13  $\mu$ L de agua. Se incubó a 70° C por 5 minutos y luego a 4° C por 5 minutos. Luego se agregó 2,5  $\mu$ L de

agua DNAsa/RNAsa free, 5  $\mu$ L de solución tampón 5X, 1,5  $\mu$ L de dNTPs 10mM (dinucleótido trifosfato) y 1  $\mu$ L de MMLV-RT. Los 25  $\mu$ L totales fueron incubados a 42° C por 90 minutos, 70° C por 15 minutos y a 4° C por 5 minutos. Se cuantificó el producto obtenido midiendo su absorbancia a 260 nm.

### PCR

Se mezcló 21,1  $\mu$ L de agua DNAsa/RNAsa free, 3  $\mu$ L de solución tampón 10X, 1,5  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (1,0mM-3,0mM), 0,6  $\mu$ L de dNTPs (10mM), 1ul de cada uno de los partidores sense y antisense (10 uM), 0,3  $\mu$ L de Taq polimerasa y 1,5  $\mu$ L de cDNA (300ng/ul).

#### **6.4.1.2. Análisis de Western blot de CB<sub>1</sub>R y adipofilina**

Se realizó una preparación de proteínas totales a partir de tejido pulverizado, utilizando solución tampón RIPA (radio immunoprecipitation assay, Pierce Biotechnology, USA) en una concentración de 5mL RIPA/g de tejido, en presencia de inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail for general use P2714, Sigma-Aldrich, USA). La cuantificación de proteínas se realizó con el método de Bradford, mediante un kit comercial (Bio-Rad Laboratories, USA), midiendo la absorbancia a 630 nm. Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 10 % con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) y posteriormente transferidas a una membrana de PVDF (polivinil idenofluoruro) a un amperaje constante de 60 mA.

### Anticuerpos utilizados

#### CB<sub>1</sub>R

Anticuerpo primario: Anticuerpo policlonal 101500 (Cayman Chemical Company, USA)  
Anti – ratón, desarrollados en conejo.

Anticuerpo secundario: Anti – IgG de Conejo, conjugado con peroxidasa (Rockland Immunochemicals, USA).

Se realizó un control negativo del western blot, utilizando el péptido de bloqueo 301500 (Cayman Chemical Company), específico para el anticuerpo policlonal 101500, con una relación péptido de bloqueo/anticuerpo policlonal de 1:1 (v/v). El anticuerpo para CB<sub>1</sub>R no se une a la proteína cuando es primeramente tratado con el péptido de bloqueo específico para su dominio inmunogénico.

Adipofilina (perilipina)

Anticuerpo primario: Anticuerpo policlonal anti-perilipina A/B PA1-1052 (Termo Scientific, USA) anti–ratón, desarrollados en conejo.

Anticuerpo secundario: Anti – IgG de Conejo, conjugado con peroxidasa (Rockland Immunochemicals).

En ambos casos se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga, usando los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo primario: Anticuerpo Monoclonal Anti  $\beta$ -actina Clone AC-15 (Sigma-Aldrich, USA). Anti- Ratón.

Anticuerpo secundario: Anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa (Rockland Immunochemicals).

El revelado del análisis de Western blot se hizo mediante quimioluminiscencia utilizando el kit comercial Western Lightning Plus- ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate (Perkin Elmer, USA). Las bandas obtenidas fueron corregidas por  $\beta$ -actina y cuantificadas por densitometría usando el programa Gel- Pro Analyzer 3.1.

El protocolo específico que se utilizó para el análisis de Western blot fue el siguiente:

## Precipitación de proteínas

Se pulverizó el tejido previamente congelado en Nitrógeno líquido. Se agregó al tejido una solución tampón RIPA (5mL RIPA/g de tejido) e inhibidor de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail for general use P2714, Sigma-Aldrich, USA), luego se agitó por 60 segundos. Se puso la muestra en hielo por 45 minutos y posteriormente se homogeneizó con un politron (2 veces por 15 segundos). Se centrifugó a 14.000 x g por 10 minutos a 4° C y se guardaron las muestras a – 80° C para su posterior análisis.

### I. Electroforesis.

Se prepararon los geles (geles de electroforesis SDS-PAGE al 10 %), se llenó la cámara interna y externa con solución tampón de electroforesis para posteriormente cargar muestras de 40 µg, previamente estandarizadas utilizando BSA (Albúmin from bovine serum, Essentially Fatty acid free, Sigma-Aldrich, USA), incluyendo un carril con 5 µL de estándar de peso molecular (Prestained Protein Marker, Broad Range, 7-175 kDa, Bio Labs, New England). Los geles se desarrollaron a 75 volts (concentrador) y 110 volts (separador).

### II. Electrotransferencia.

Se ensambló el dispositivo de transferencia en húmedo y se puso en la cubeta para ser llenado con solución tampón de transferencia frío. Se transfirieron las membranas de PVDF a amperaje constante (60 mA) durante toda la noche a 4° C con agitación continua.

### III. Incubación con anticuerpos.

Una vez terminada la transferencia, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau para comprobar una transferencia efectiva. Se bloquearon las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave (solución de bloqueo: TBS-Tween-leche 5%). Se lavaron las membranas 4 veces por 10 minutos en agitación fuerte con TBS-Tween.

Posteriormente se incubaron las membranas con el anticuerpo primario 2 horas a temperatura ambiente en agitación suave. Se lavaron nuevamente las membranas 4 veces por 10 minutos en agitación fuerte con TBS-Tween y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron las membranas 3 veces por 10 minutos en agitación fuerte con TBS-Tween y 2 veces por 5 minutos en agitación fuerte con TBS 1x para proceder a revelar.

#### **6.4.1.3. Análisis de actividad enzimática de LPL de superficie y FAAH**

##### **LPL de superficie**

Para evaluar la actividad enzimática de la LPL de superficie en la grasa epididimal de ratones adultos sacrificados, se realizó la prueba fluorométrica continua de lipasa Confluolip (Progen Biotechnik, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

##### **FAAH**

Para evaluar la actividad enzimática de la FAAH en la grasa epididimal de ratones adultos sacrificados, se midió su capacidad para hidrolizar ADA a ácido araquidónico y etanolamina, a 37° C durante 15 minutos en 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 9,0 y en presencia de <sup>3</sup>H-ADA como trazador.

El protocolo específico que se utilizó para medir la actividad enzimática de la FAAH fue el siguiente:

##### Preparación de la muestra

A 100 mg de tejido pulverizado se agregó solución tampón A (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA ph7,4) y se homogeneizó para proceder a centrifugar el homogeneizado a 800 x g por 5 minutos. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 11.000 x g por 20 minutos a 4° C.

Finalmente las muestras fueron congeladas en Nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

### Reacción

La reacción enzimática comenzó al agregar la muestra de proteína proveniente de grasa epididimal al tubo de reacción. Se agregó un volumen de muestra para tener  $40\ \mu\text{g}$  de proteína en el ensayo, y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos en un volumen final de  $200\ \mu\text{L}$  de solución tampón de reacción ( $50\text{mM}$  Tris-HCl pH 9,0), que contenía  $20\ \mu\text{M}$  de ADA y  $0,25\ \mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -ADA. La reacción se detuvo agregando  $800\ \mu\text{L}$  de etanol / cloroformo 2:1 (frío) y agitando por un minuto. Posteriormente se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos y se agregó  $240\ \mu\text{L}$  de cloroformo y  $240\ \mu\text{L}$  de agua. Se agitó y se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se centrifugó a  $1200\ \text{x g}$  por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , la fase superior acuosa se retiró y la fase orgánica se secó bajo corriente de Nitrógeno. Luego se resuspendió la muestra en  $50\ \mu\text{L}$  de metanol y se agregó  $1\ \mu\text{L}$  de ADA en aceite ( $10\ \text{mg/ml}$ ) para una mejor separación en la cromatografía en placa fina (TLC Silica gel 60 F254, Merck-Chemicals, Alemania), la que fue cargada, previamente activada a  $120^{\circ}\text{C}$  por una hora. La placa se desarrolló utilizando como fase móvil acetato de etilo / hexano / ácido acético 6:3:1 (v/v) y se dejó secar unos minutos a temperatura ambiente para posteriormente ser revelada en una cámara con vapores de Iodo. Se marcó la coloración correspondiente a ADA (parte media de la placa) y ácido araquidónico (parte superior de la placa), luego las marcas se cortaron y se extrajo la silica desde el soporte de la placa. El polvo de silica se puso en viales de centelleo y se agregaron  $8\ \text{ml}$  de líquido de centelleo, se agitó y se procedió a evaluar la radioactividad, mediante espectrofotometría de centelleo líquido.

#### **6.4.2. Determinaciones en niveles plasmáticos**

Las determinaciones de los niveles plasmáticos de ir-CTT se realizaron mediante el ensayo de Elisa comercial (Cayman Chemical Company, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las determinaciones de leptina y adiponectina se realizaron mediante el

ensayos de Elisa comerciales (R&D Systems, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los resultados fueron expresados como la Media  $\pm$  E.S.M. Respecto al número de animales utilizados, se determinó que el número apropiado de animales a utilizar en cada grupo era entre 9 y 12 para mediciones de PC y peso de panículos adiposos epididimales y entre 4 y 6 animales para análisis RT-PCR, Western blot, actividad enzimática y niveles hormonales. Este tamaño de muestra fue obtenido mediante el análisis de datos previamente reportados (Loizzo *et al.*, 2006), para PC, niveles de triglicéridos circulantes y glicemia con sus respectivas desviaciones estándar, utilizando el Programa 3.02, Stanton A. Glantz (90% de poder y 0,05 de error).

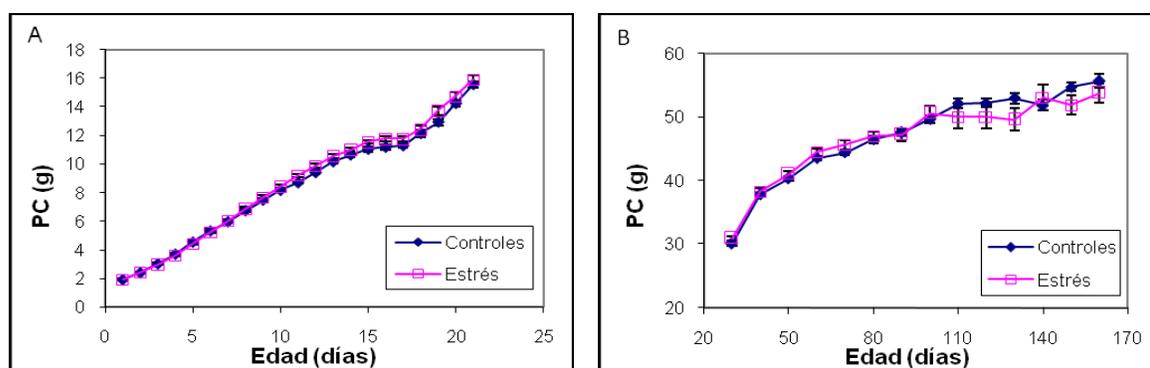
Previo análisis Shapiro-Wilk, para determinar si la distribución de datos es normal, el análisis estadístico de los resultados obtenidos en PC, peso de panículo adiposo epididimal, ingesta de alimento, niveles hormonales, actividad enzimática y expresión de mRNA y proteínas de ambos grupos de ratones fue mediante comparación entre dos grupos usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney U (95% de confianza y  $P < 0,05$ ), dado que por la cantidad de animales utilizados en el estudio, la distribución de datos no es normal.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Determinaciones en animales vivos Control y Estrés (día 1-160):

#### 8.1.1. Ganancia de PC (día 1-160).

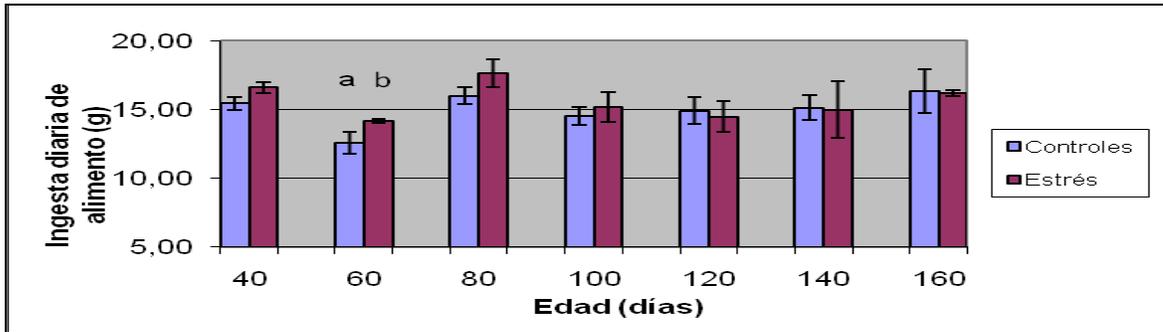
Los resultados en incremento de PC (g), tanto de animales controles como de animales estresados no mostraron diferencias significativas en mediciones realizadas a diario durante el período de lactancia, tal como se observa en la Fig. 1A, lo mismo ocurrió en las mediciones realizadas cada 10 días en el estado adulto (día 30-160), donde tampoco se encontraron diferencias significativas en la curva de incremento de PC entre ambos grupos de animales (Fig. 1B).



**Fig.1 A-B: Curva de incremento de PC, durante la lactancia (A) y en estado adulto (B), de animales controles y estresados (Media  $\pm$  ESM; n= 18).**

#### 8.1.2. Ingesta alimentaria (día 30-160).

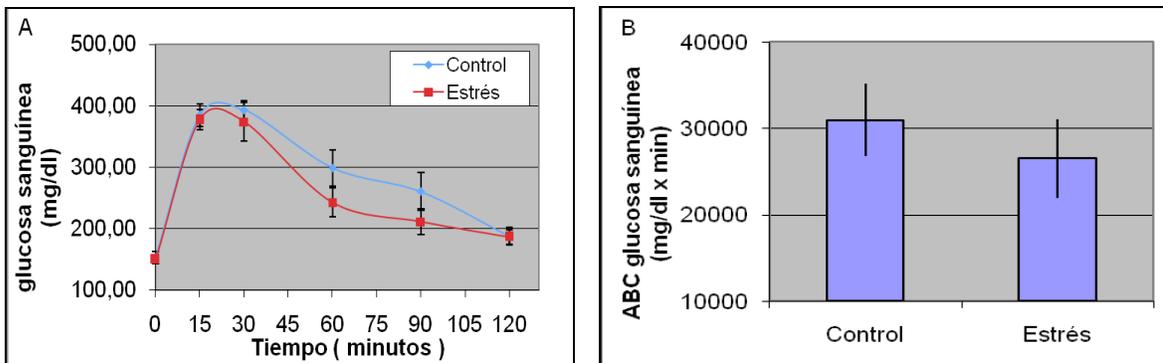
La figura 2 muestra que no se encontraron diferencias significativas en el consumo diario de alimento (en jaulas de 3 animales c/u, en 24 horas) en ambos grupos de animales, durante casi la totalidad del estudio, donde sólo en 1 de 14 mediciones desde el día 30 al 160, el consumo de los animales estresados superó significativamente a sus controles (día 60:  $14,14 \pm 0,14$  vs  $12,60 \pm 0,80$  g,  $P < 0,02$  ; Mann-Whitney U test) Estrés vs Control respectivamente.



**Fig.2:** Ingesta diaria de alimento, corregida por pérdida de alimento en jaulas de 3 animales. Mediciones a distintas edades a partir de los 40 días de edad. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ; Mann-Whitney U test; consumo promedio/jaula  $\pm$  ESM;  $n = 18$ ).

### 8.1.3. Tolerancia a la glucosa (día 150).

Los análisis de glicemia (previo ayuno de 6 horas) realizados a 6 animales de ambos grupos a los 150 días de edad, no mostró diferencias significativas en la curva de glucosa sanguínea (mg/dl) entre el grupo Control y el grupo Estrés (Fig. 3A). Para complementar el análisis se realizaron mediciones del área bajo la curva (ABC), calculadas en mg/dl x min, donde los promedios para cada grupo tampoco mostraron diferencias significativas (Fig. 3B).



**Fig.3 A-B:** Prueba de tolerancia a la glucosa, expresada en mg/dl de glucosa sanguínea (A), y como ABC en mg/dl x min (B), en animales controles y estresados a los 150 días de edad (Media  $\pm$  ESM;  $n = 5$ ).

## 8.2. Determinaciones en animales adultos sacrificados Control y Estrés (día 160):

### 8.2.1. Determinaciones en panículo adiposo epididimal (PAE).

#### 8.2.1.1. Peso del PAE

El peso del PAE (g) fue significativamente mayor en el grupo de los animales estresados que en sus respectivos controles ( $2,11 \pm 0,12$  g vs  $1,45 \pm 0,12$  g  $P < 0,006$ ), siendo casi 50% más pesados (Fig. 4A). Al expresar los resultados del peso del PAE (g) como porcentaje del PC (g), se repiten estas diferencias:  $3,49 \pm 0,18$  vs  $2,75 \pm 0,18$  %;  $P < 0,0223$ ; Estrés vs Control respectivamente, sobrepasando el grupo Estrés, en 26,9 % a sus controles (Fig. 4B).

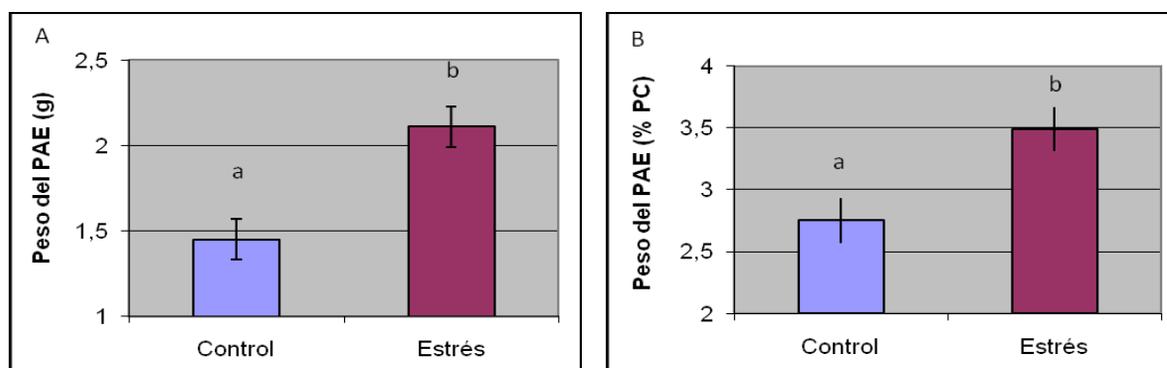


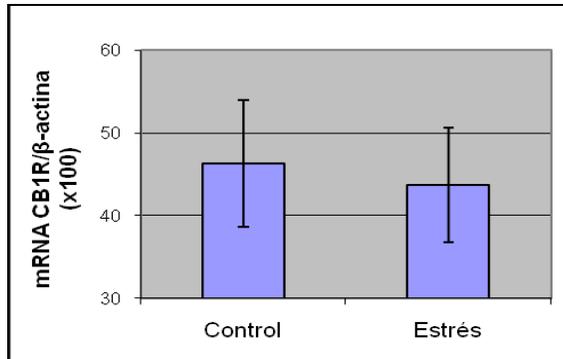
Fig.4 A-B: Peso del PAE (A), y peso del PAE expresado como % del PC (B), en animales adultos controles y estresados. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ; Mann-Whitney U test; Media  $\pm$  ESM;  $n = 13$  Control y  $n = 14$  Estrés).

#### 8.2.1.2. Análisis de RT-PCR y Western blot de CB<sub>1</sub>R y adipofilina

##### CB<sub>1</sub>R

##### Análisis RT-PCR para CB<sub>1</sub>R

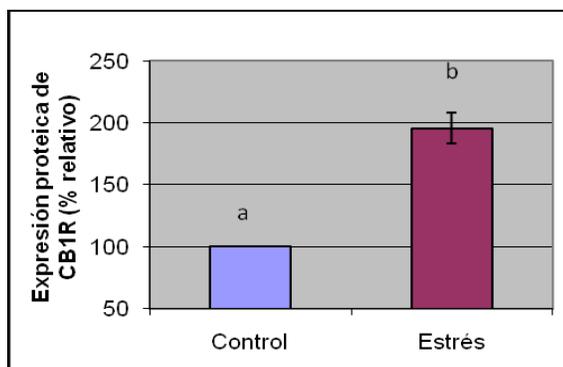
Mediante el análisis de RT-PCR, la expresión de mRNA de CB<sub>1</sub>R, cuya cuantificación densitométrica fue corregida por expresión de  $\beta$ -actina, no presentó diferencias significativas entre ambos grupos (Fig. 5).



**Fig.5:** Expresión de mRNA de CB<sub>1</sub>R en grasa epididimal corregida por β-actina, de animales adultos controles y estresados (Media ± ESM; n = 5).

### **Análisis Western blot para CB<sub>1</sub>R**

Mediante el análisis de western blot, se obtuvo que los niveles de la proteína CB<sub>1</sub>R en grasa epididimal de los animales adultos estresados, expresados como porcentaje relativo de los valores obtenidos en el grupo Control (previamente calculados como porcentaje relativo de β-actina, proteína utilizada como control de carga para la cuantificación densitométrica), mostraron una expresión significativamente mayor, alcanzando casi el doble de sus controles, sobrepasando la expresión de estos últimos en 95,60 % ± 12,50 %, P<0,043 (Fig. 6).



**Fig.6:** Expresión proteica de CB<sub>1</sub>R en grasa epididimal de animales adultos controles y estresados. Los resultados fueron expresados como % relativo de los valores obtenidos en el grupo Control. Se utilizó β-actina como control de carga. Letras distintas indican diferencias significativas (P < 0,05; Mann-Whitney U test; n=5).

## Adipofilina

### Análisis RT-PCR para Adipofilina

Mediante el análisis de RT-PCR, la expresión de mRNA de adipofilina, cuya cuantificación densitométrica fue corregida por expresión de  $\beta$ -actina, no presentó diferencias significativas entre ambos grupos (Fig. 7).

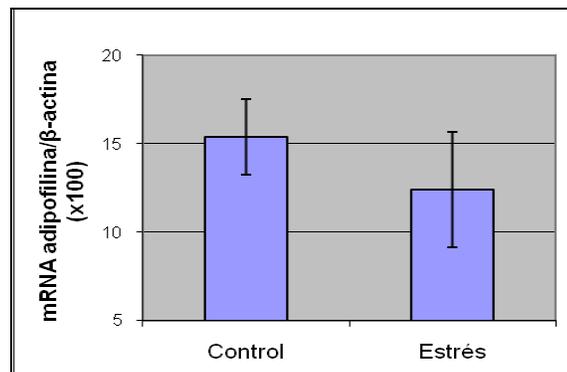
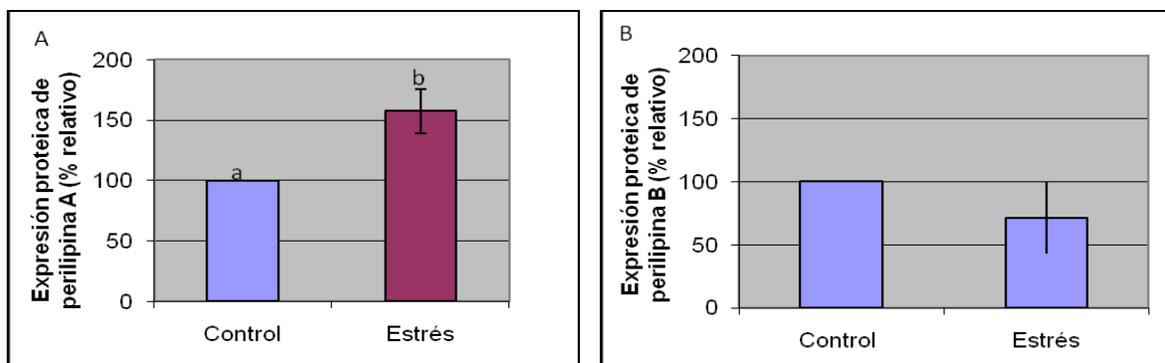


Fig.7: Expresión de mRNA de adipofilina en grasa epididimal corregida por  $\beta$ -actina, de animales adultos controles y estresados (Media  $\pm$  ESM; n = 5).

### Análisis Western blot para Adipofilina (perilipinas)

Dado que la adipofilina se ha definido como una familia de proteínas presentes en el adiposoma, y conocidas previamente como perilipinas; se evaluó mediante el análisis de western blot, los niveles de perilipina A y B. La proteína A en grasa epididimal de los animales adultos estresados, expresados como porcentaje relativo de los valores obtenidos en el grupo Control (previamente calculados como porcentaje relativo de  $\beta$ -actina, proteína utilizada como control de carga para la cuantificación densitométrica), mostraron una expresión significativamente mayor, sobrepasando la expresión de esta proteína en sus controles en 57,30 %  $\pm$  18,00 %,  $P < 0,02$  (Fig. 8A), mientras que los resultados para perilipina B no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos (Fig. 8B).

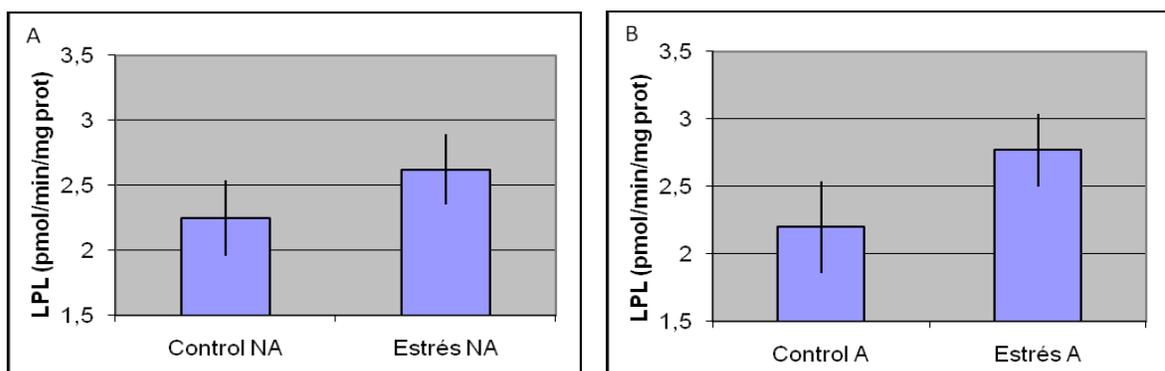


**Fig.8 A-B:** Expresión proteica de perilipina A (A) y perilipina B (B) en grasa epididimal de animales adultos controles y estresados. Los resultados fueron expresados como % relativo de los valores obtenidos en el grupo Control. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ; Mann-Whitney U test;  $n=5$ ).

### 8.2.1.3. Actividad enzimática de LPL y FAAH

#### Lipasa lipoproteica de superficie (LPL).

Las figuras 9 (A y B), muestran que no se encontraron diferencias significativas en las determinaciones de la actividad de la enzima LPL, asociada al PAE, realizadas en condición de no ayuno y ayuno respectivamente, sin embargo, existe una tendencia a mayores niveles de actividad de esta enzima en los animales estresados, sobrepasando en un 16,40 % a los valores de sus controles en condición de no ayuno, y en 25,90 % en condición de ayuno.



**Fig.9 A-B:** Niveles de actividad enzimática de la LPL, en condición de no ayuno (A) y ayuno (B), en animales adultos controles y estresados (Media  $\pm$  ESM;  $n = 5$ ).

## Amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH).

Los resultados obtenidos en la actividad enzimática de la FAAH, extraída desde PAE de ambos grupos de animales, y medida como su capacidad para hidrolizar ADA a ácido araquidónico y etanolamina, indican que dicha actividad está significativamente disminuida en los animales estresados ( $P < 0,011$ ), alcanzando en éstos sólo un  $53,80\% \pm 7,90\%$  en relación a sus controles (Fig. 10).

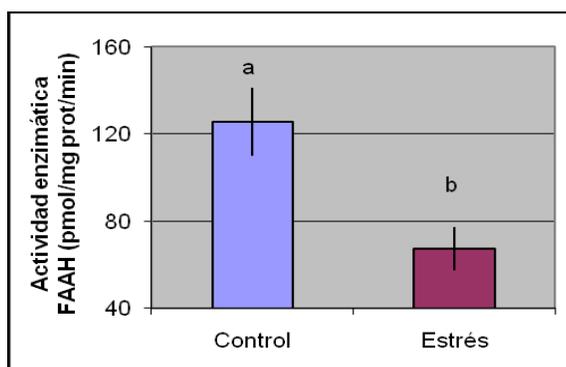
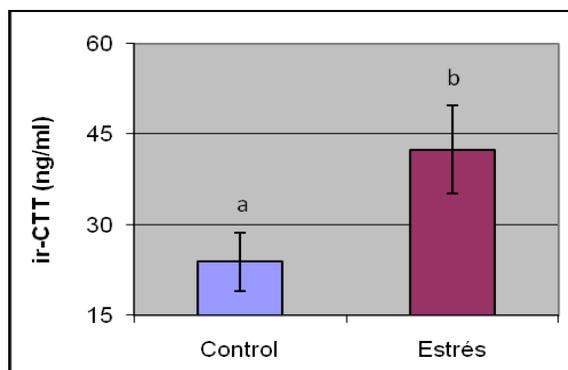


Fig.10: Niveles de actividad enzimática de la FAAH, en animales adultos controles y estresados. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ; Mann-Whitney U test; Media  $\pm$  ESM; n= 4 y 5).

## 8.2.2. Determinaciones de niveles plasmáticos.

### 8.2.2.1. Corticosterona inmunoreactiva (ir-CTT).

Los niveles plasmáticos de ir-CTT de animales estresados son significativamente mayores que los del grupo Control ( $42,47 \pm 7,30$  vs  $23,90 \pm 4,80$  ng/ml,  $P < 0,04$ ), sobrepasando el grupo Estrés en cerca del 80% a sus controles (Fig. 11), lo que nos indica que la aplicación de estrés durante la lactancia fue efectiva, manteniéndose sus efectos hasta la adultez, en relación a la concentración de esta hormona.

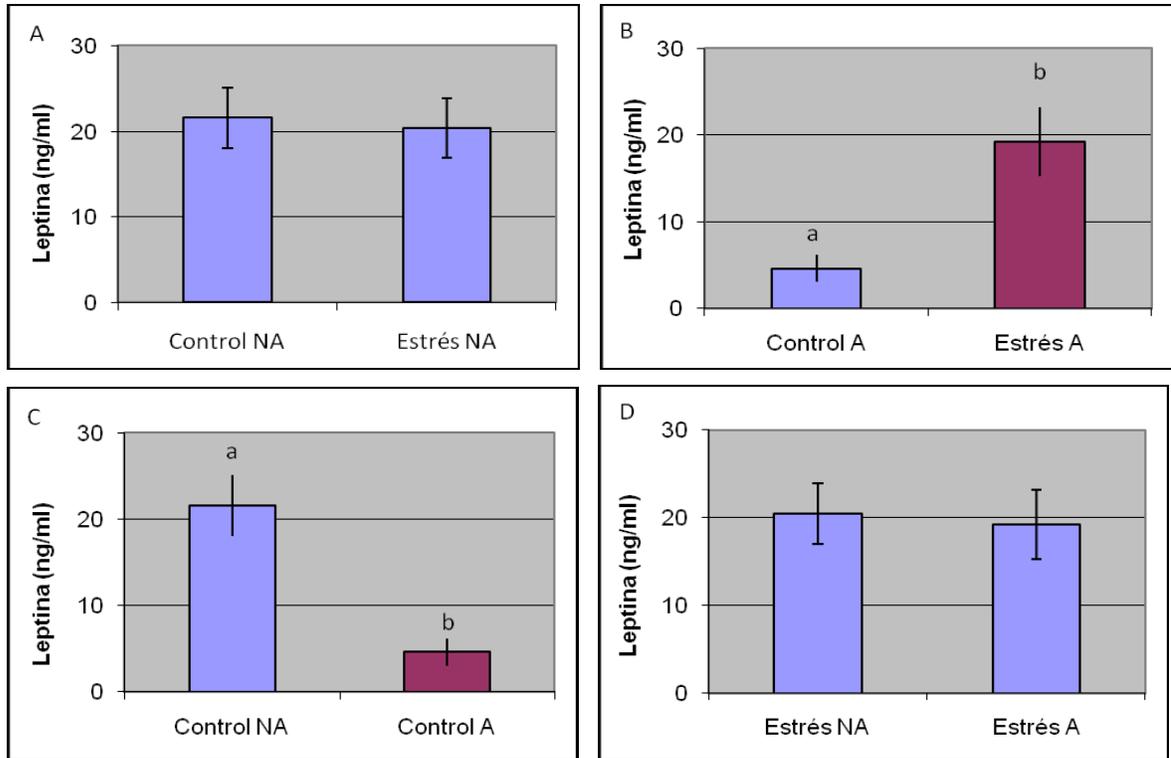


**Fig.11: Niveles plasmáticos de ir-CTT en animales adultos controles y estresados. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ; Mann-Whitney U test; Media  $\pm$  ESM;  $n= 8$  y 11).**

### 8.2.2.2. Leptina.

Las figuras 12A (no ayuno = NA) y 12B (ayuno = A), muestran que a diferencia de la condición de no ayuno, en ayuno los niveles plasmáticos de leptina son significativamente mayores en los animales estresados vs sus controles ( $19,20 \pm 3,98$  vs  $4,60 \pm 1,55$  ng/ml;  $P < 0,018$ ) respectivamente, sobrepasando el grupo Estrés en un 317,40% al grupo Control, mientras que en condición de no ayuno no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

Las figuras 12C y 12D, indican que sólo en el grupo de los animales Control existen diferencias significativas en los niveles de leptina plasmática al comparar las condiciones de no ayuno y ayuno ( $21,60 \pm 3,55$  vs  $4,60 \pm 1,55$  ng/ml,  $P < 0,005$ ), disminuyendo su concentración en sangre en cerca del 80% bajo la condición de ayuno, en tanto que el grupo Estrés no mostró diferencias significativas entre ambas condiciones.

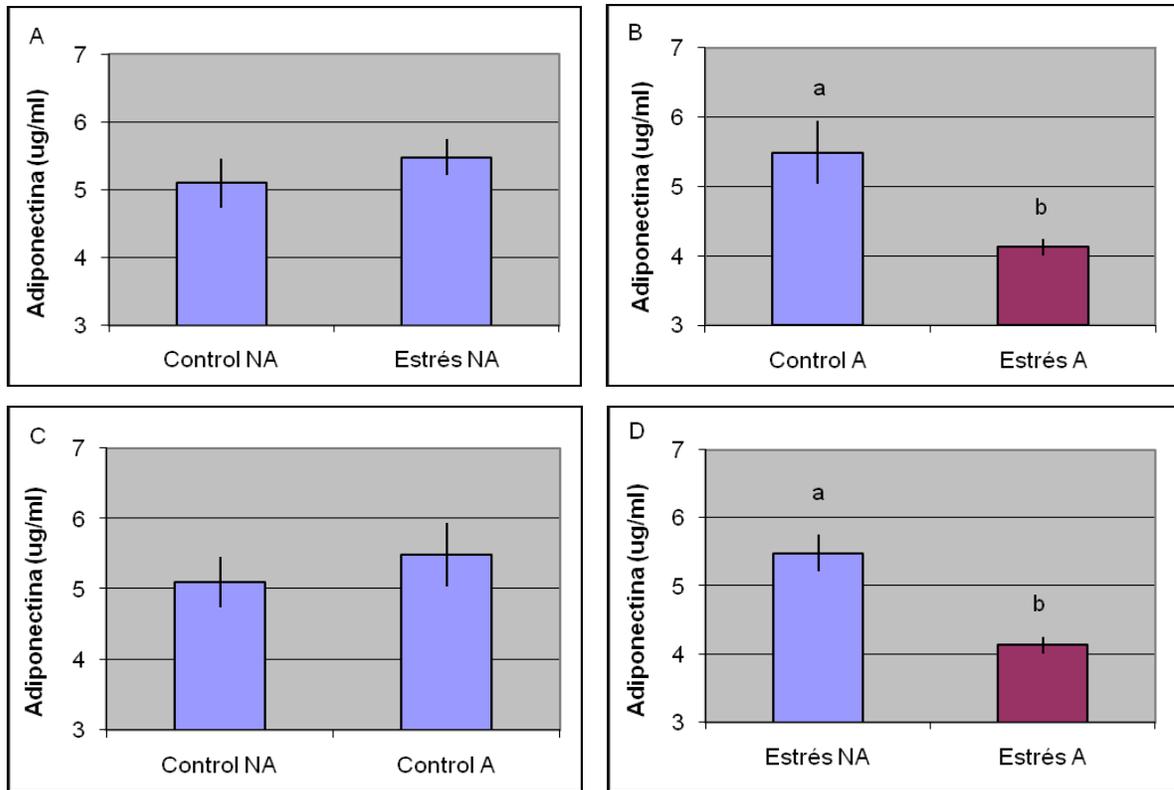


**Fig.12 A-D: Niveles plasmáticos de leptina, en condición de no ayuno (A) y ayuno (B), en animales adultos controles y estresados. Además se muestra la comparación de la condición de no ayuno-ayuno en animales controles (C) y estresados (D). Letras distintas indican diferencias significativas (P < 0,05; Mann-Whitney U test; Media ± ESM; n = 6).**

### 8.2.2.3. Adiponectina.

Las figuras 13A (no ayuno = NA) y 13B (ayuno = A), muestran que a diferencia de la condición de no ayuno, en ayuno los niveles plasmáticos de adiponectina son significativamente menores en el grupo Estrés en relación a sus controles ( $4,13 \pm 0,12$  vs  $5,49 \pm 0,45$  ug/ml,  $P < 0,027$ ) respectivamente, siendo 24,80% menor, mientras que en condición de no ayuno no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

Las figuras 13C y 13D, indican que sólo en el grupo de los animales estresados existen diferencias significativas en los niveles de adiponectina plasmática al comparar las condiciones de no ayuno y ayuno ( $5,48 \pm 0,27$  vs  $4,13 \pm 0,12$  ug/ml,  $P < 0,006$ ), disminuyendo su concentración en sangre en cerca del 25% bajo la condición de ayuno, en tanto que el grupo Control no mostró diferencias significativas entre ambas condiciones.



**Fig.13 A-D: Niveles plasmáticos de adiponectina, en condición de no ayuno (A) y ayuno (B), en animales adultos controles y estresados. Además se muestra la comparación de la condición de no ayuno-ayuno en animales controles (C) y estresados (D). Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ; Mann-Whitney U test; Media  $\pm$  ESM; n = 6).**

## 9. DISCUSIÓN

En este estudio se observó que la aplicación de estrés durante el período de lactancia en ratones macho genéticamente no susceptibles a desarrollar S/O, provocó una serie de alteraciones metabólicas que se manifestaron en el estado adulto, con un mayor peso del pániculo adiposo epididimal (PAE), mayor porcentaje de grasa epididimal en relación al PC, mayor expresión proteica de CB<sub>1</sub>R y adipofilina en el PAE y mayores niveles plasmáticos de ir-CTT y leptina. Los niveles de actividad enzimática de la LPL de superficie asociada al PAE también fueron mayores en los animales estresados pero sus diferencias no alcanzaron a ser significativas; sin embargo, los niveles de adiponectina plasmática y la actividad enzimática de la FAAH (enzima encargada de la degradación del EC anandamida) asociada al tejido adiposo epididimal, fueron significativamente menores en el grupo Estrés en comparación a sus controles.

Respecto a la permanencia de un elevado nivel de ir-CTT plasmática en los animales adultos que fueron estresados durante la lactancia (Fig.11), y que coinciden con los encontrados en la literatura en similares condiciones (Loizzo *et al.*, 2006), podemos deducir que la aplicación del estrés temprano podría haber programado una alteración permanente en la regulación de esta hormona, posiblemente afectando directamente al eje HPA en un período crítico de su desarrollo, incluyendo a las señales de retroalimentación negativa ejercidas por los GCs. En este sentido, últimamente se ha reportado que dichas señales de inhibición por parte de los GCs en el eje HPA, estarían mediadas por el SEC, donde la unión de los GCs a sus receptores en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), estimularían la síntesis de EC, los cuales serían liberados en la sinapsis retrógrada y su unión a los CB<sub>1</sub>R en la membrana presináptica disminuirían la liberación de glutamato, lo que finalmente conduciría a una menor liberación de CRH a nivel neuronal (Di *et al.*, 2003), este mecanismo explicaría lo que otros autores han experimentado al inyectar GCs en hipotálamo, aumentando la liberación de EC (Di Marzo y Matías, 2005). Sin embargo este mecanismo se vería alterado a causa de la reprogramación del eje HPA por el estrés temprano, el cual genera una liberación continua de EC a nivel hipotalámico. Las altas concentraciones de EC hipotalámicos indican una adaptación al estrés crónico, llevando a una desensibilización de su mecanismo de acción a nivel del eje HPA,

manteniéndose éste hiperactivo hasta el estado adulto, y generando como consecuencia elevados niveles de corticosterona plasmáticos.

Por otra parte, estudios indican que el estrés postnatal al que es sometida una cría de ratón a diario (como al que fueron sometidas las crías en este estudio), induce cambios hormonales, de comportamiento y metabólicos que pueden perdurar en el estado adulto (Ruda *et al.*, 2000), nuestros resultados indican que las manipulaciones de menor invasividad efectuadas a los animales, como la separación de sus madres para los cambios de jaula y mediciones de PC diario, no provocarían por sí solos esta programación anormal del eje HPA, ya que los niveles de ir-CTT sólo se mantuvieron significativamente elevados en los animales adultos que recibieron la inyección subcutánea de suero fisiológico durante la lactancia, lo que nos hace atribuir a esta estimulación nociceptiva, las alteraciones observadas a diversos niveles en los animales adultos previamente estresados.

Respecto a las mediciones de PC, a diferencia de estudios previos, donde los animales estresados durante la lactancia presentaron un aumento de PC en el estado adulto (Loizzo *et al.*, 2006), en este estudio no se encontraron diferencias significativas de PC en los animales estresados en comparación a los controles (Fig.1 A-B). Tampoco se encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento entre ambos grupos, donde sólo en 1 de las 14 mediciones, el consumo fue mayor en el grupo Estrés (Fig.2). Por consiguiente, dado que no hay un aumento en el consumo de alimento, no es posible relacionar este resultado con los efectos rápidos de los GCs sobre la ingesta alimentaria, tal como se ha reportado anteriormente (Di Marzo y Matías, 2005). Estos autores han sugerido que situaciones de estrés como podría ser un período de ayuno, llevan a un aumento de los EC hipotalámicos y por consiguiente a una activación de los CB<sub>1</sub>R, lo que induce una mayor ingesta alimenticia (Di marzo *et al.*, 2001).

Adicionalmente, los resultados obtenidos a nivel del PAE, caracterizados por un mayor almacenamiento de grasa (Fig.4 A-B) a causa de la reprogramación del tejido debido al estrés temprano, tampoco estarían obedeciendo a una respuesta central tardía el estrés, sino que más bien estarían sugiriendo una alteración a largo plazo en el control periférico del metabolismo energético. Esta alteración a nivel periférico, estaría mediada en nuestro caso por un SEC sobreactivado, caracterizado por una mayor expresión de CB<sub>1</sub>R (Fig.6) y una menor actividad de FAAH a nivel del tejido adiposo epididimal (Fig.10).

Respecto a una disminución del gasto energético, como una respuesta central al estrés que pudiera explicar la mayor acumulación de grasa epididimal, en este estudio no se realizaron mediciones de actividad locomotora a los animales (gasto por actividad física), sin embargo podríamos descartar en base a estudios previos, que los animales estresados hayan presentado una disminución de ésta, ya que la literatura indica que la actividad locomotora no difiere entre ambos grupos de animales en similares condiciones (Loizzo *et al.*, 2006).

Los trastornos en el tejido adiposo, que optimizan el almacenamiento de grasa a causa de una alteración en el control del metabolismo energético periférico como respuesta al estrés temprano, cobran mayor interés al analizar los resultados obtenidos a nivel de glucosa circulante, los cuales nos indican que el metabolismo de glucosa, a diferencia de lo indicado en estudios anteriores (Loizzo *et al.*, 2006), no se encontraría alterado, ya que una prueba de tolerancia a la glucosa realizada a los animales de 150 días de edad no fue diferente entre ambos grupos (Fig.3A). En la Fig. 3B se observó además, que tampoco hubo diferencias significativas al analizar las áreas bajo la curva (ABC) correspondientes a dicha prueba de tolerancia, lo que coincide con los resultados encontrados en PC y en control de ingesta; dirigiendo aún más nuestro interés a las alteraciones producidas en el tejido adiposo. En este sentido, es importante analizar el comportamiento de hormonas de dicho tejido como lo son la leptina y la adiponectina, como también un importante marcador de acumulación lipídica como lo es la adipofilina o perilipina.

Así, al determinar los niveles de leptina en condición de ayuno, estos fueron significativamente mayores en los animales estresados (Fig. 12B), al igual que los resultados citados en la literatura (Loizzo *et al.*, 2006), lo cual coincide con los resultados de peso de grasa epididimal (Fig. 4A), mostrando una correlación positiva entre estos parámetros, como se ha descrito en estudios anteriores (Maffei *et al.*, 1995; Considine *et al.*, 1996). Los niveles de esta hormona se mantuvieron elevados en la condición de ayuno, incluso similares a los elevados valores encontrados en condición de no ayuno en los animales estresados (Fig.12D), en tanto que los niveles de esta hormona disminuyeron de la manera esperada en la condición de ayuno en los animales controles (Fig.12C). Estos resultados sugieren una alteración programada y permanente en la retroalimentación de esta hormona a nivel central a causa del estrés temprano, y donde el eje HPA se encontraría

sobreactivado, generando una liberación aumentada de corticosterona, la cual estaría estimulando mediante el SEC la proliferación de adipocitos además de su crecimiento por acumulación de triglicéridos. Estudios anteriores en líneas celulares de adipocitos de ratón, mediante el uso de SR141716A (antagonista selectivo de CB<sub>1</sub>R) sugieren que los EC estimulan su proliferación (Gary-Bobo *et al.*, 2006) y la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros con la aparición del marcador temprano de diferenciación PPAR- $\gamma$ .

Los niveles aumentados de leptina, a causa del mayor tamaño del tejido graso epididimal, actuando en condiciones normales a nivel central, debería disminuir la ingesta de alimentos mediante la estimulación de importantes agentes anorexígenos y antagonizando los efectos de otros agentes orexígenos, además de aumentar el gasto energético y modular el metabolismo de glucosa y lípidos para disminuir el depósito en los adipocitos, con el fin de mantener constante su tamaño (Maffei *et al.*, 1995). Sin embargo, y debido a la posible reprogramación del eje HPA ya planteada a causa del estrés temprano, y que conduce a un mayor desarrollo del PAE en el estado adulto, los niveles de leptina secretados por los adipocitos maduros en la adultez serían muy elevados (lo que explicaría la semejanza en las determinaciones de leptina entre ambos grupos, realizadas a los 21 días en este laboratorio en similares condiciones, donde seguramente el PAE aún no estaba aumentado de tamaño). Estas altas cantidades de leptina circulante, podrían estar dificultando aún más la retroalimentación negativa de los GCs mediada por el SEC sobre la actividad aumentada del eje HPA a causa de la reprogramación por estrés temprano.

Como se ha descrito anteriormente, la elevación de los niveles hipotalámicos de EC están inversamente correlacionados con los niveles sanguíneos de leptina, donde su aumento reduce la síntesis de ADA y 2-AG en el hipotálamo (Di Marzo *et al.*, 2001), de esta manera se sugiere que al encontrar elevados niveles sanguíneos de leptina, encontraríamos menores niveles de EC en hipotálamo y por ende, la acción inhibitoria de los GCs mediante el SEC hacia el eje HPA, estaría disminuida, fomentando su hiperactivación con las respectivas consecuencias sobre el metabolismo energético periférico, donde la liberación crónica de corticosterona sobreactivaría al SEC a este nivel.

Respecto a la posibilidad de que los elevados niveles plasmáticos de leptina encontrados en condición de ayuno se deban a la presentación de resistencia a la hormona, en este estudio no se observó obesidad en los ratones estresados, ni diferencias en el

consumo, como se ha reportado en variados trabajos que avalan la relación entre resistencia a leptina y la presentación de obesidad (Frederich *et al.* 1995), sin embargo no es posible descartar esta posibilidad sin realizar pruebas de sensibilidad a la hormona. Además es importante recordar que la leptina tiene participación en otros tejidos involucrados en la homeostasis de energía, ya que se han encontrado efectos de esta hormona en la proliferación de células  $\beta$ - pancreáticas (Wang *et al.*, 1998), lo que hace de esta hormona una pieza clave en los estudios del metabolismo energético y de otros sistemas asociados a la recuperación de la homeostasis frente a condiciones adversas.

Nuestros resultados sugieren que los niveles constantemente aumentados de leptina formarían un círculo vicioso potenciando los niveles ya aumentados de corticosterona debido a una reprogramación temprana. En este sentido, la leptina participa en el mecanismo de la liberación de CRH en el PVN del hipotálamo (Schwartz *et al.*, 1996), presumiblemente a través de la inhibición de los niveles de los EC anandamida y 2-AG, los cuales no se encontrarían disponibles para la activación de los CB<sub>1</sub>R presinápticos, lo que derivaría en un aumento en la liberación de CRH al verse imposibilitada la regulación retrógrada mediada por el SEC de los GCs sobre el eje HPA.

Los cambios observados en el PAE en este estudio incluyen además una disminución significativa de los niveles plasmáticos de adiponectina en la condición de ayuno (Fig.13B), cuyo rol en la reducción de la expresión de enzimas involucradas en lipogénesis y oxidación de ácidos grasos en músculo se encontraría disminuida en los animales estresados en comparación a sus controles. Además los niveles plasmáticos de esta hormona serían significativamente menores a los encontrados en la condición de no ayuno en los mismos animales estresados (Fig. 13D), a diferencia de los animales controles, donde los niveles plasmáticos de adiponectina no varían entre ambas condiciones (Fig. 13C).

Respecto a una posible resistencia a insulina, en este estudio no se realizaron mediciones de sensibilidad a esta hormona, pero en estudios previos en similares condiciones, se ha encontrado una tendencia a resistencia a la insulina en los animales estresados, lo que podría deberse entre otras causas a una disminución en la función de la adiponectina a causa de la disminución de sus niveles plasmáticos, ya que esta hormona, además de su participación en el metabolismo lipídico, también se relaciona con el

metabolismo de glucosa, aumentando su utilización a nivel muscular y potenciando la inhibición de gluconeogénesis hepática mediada por insulina, estimulando la sensibilidad a esta hormona (Berg *et al.*, 2002). Por lo tanto, los menores niveles plasmáticos de adiponectina en los ratones estresados, podrían indicar tendencia a una disminuida sensibilidad a insulina en dichos animales.

En este estudio, concomitante con la acumulación de grasa epididimal, se evidencia un aumento en la expresión proteica del CB<sub>1</sub>R y una disminución en la actividad enzimática de la FAAH, lo que traería como consecuencia una sobre activación de los CB<sub>1</sub>R. Ahora bien, nuestros resultados coinciden con los de trabajos anteriores, donde se indica que la activación de CB<sub>1</sub>R produce un aumento de la actividad de la LPL de superficie (Cota *et al.*, 2003) y una disminución en los niveles plasmáticos de adiponectina (Bensaid *et al.*, 2003), condición asociada a una acumulación global de tejido adiposo en diversos niveles y que se evidencia además con los resultados obtenidos en la expresión del marcador de acumulación lipídica adipofilina, la que se encuentra aumentada en los animales estresados (Fig.8). Además, estudios previos realizados en ratones “knockout” para CB<sub>1</sub>R (CB<sub>1</sub>R -/-), demuestran que éstos animales son más livianos, más delgados, con menor acumulación de masa grasa y más masa magra que los ratones CB<sub>1</sub>+/+ (Cota *et al.*, 2003).

Respecto a los resultados de las determinaciones de mRNA para el CB<sub>1</sub>R y adipofilina (Figuras 5 y 7), no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de animales a diferencia de sus expresiones proteicas, las que se encontraron elevadas en el grupo Estrés (Figuras 6 y 8). Esto puede ser explicado por la posibilidad de encontrarnos en presencia de proteínas de larga vida media, lo que las haría más estables con una mayor permanencia a nivel intracelular, lo que podría estar ligado a una disminución de sus mecanismos de degradación, tanto lisosomal como mediante el sistema ubiquitina proteasoma (Ciechanover, 2005; Reinstein y Ciechanover, 2006). Por otro lado, es posible que la explicación se encuentre a nivel del mRNA, teniendo éste una mayor vida media o una mayor eficiencia en el proceso de traducción para producir la proteína CB<sub>1</sub>R o adipofilina. Trabajos previos (Pillai *et al.*, 2007), indican que micro RNAs (miRNA) son capaces de modular el proceso de traducción sin afectar los niveles de mRNA. Particularmente interesante para nuestro modelo de estrés, recientemente se ha demostrado

que los niveles de miRNAs en distintas regiones del cerebro aumentan debido a un estrés de restricción de movimiento al que se someten los animales de experimentación (Rinaldi *et al.*, 2009). Si bien es cierto que en general los miRNAs reprimen la traducción de la proteína, no es posible descartar a futuro un efecto estimulador de la síntesis de proteína afectando la eficiencia de la traducción del mRNA o bien la vida media de éste. Sería interesante poder establecer que el estrés temprano tendría consecuencias a largo plazo en la reprogramación espacio-temporal de los niveles de mRNA en distintos tejidos involucrados en la homeostasis de energía, con consecuencias finales en la eficiencia de producción de proteínas intracelulares como respuesta a diversas situaciones adversas. Creemos que esta área podría dar origen a investigaciones futuras y promisorias en nuestro modelo animal.

## 10. CONCLUSIÓN

La presencia de un SEC hiperactivo a nivel del tejido adiposo podría deberse a un estímulo continuo por parte de la corticosterona a causa de la reprogramación del eje HPA por el estrés temprano, reforzado a largo plazo por los niveles aumentados de leptina plasmática. Esta actividad aumentada del SEC se caracteriza molecularmente por una mayor expresión proteica del CB<sub>1</sub>R en una acción concertada con la menor actividad enzimática de la FAAH en el PAE de los ratones estresados, lo que produce una actividad sostenida de dichos receptores, no sólo por su mayor expresión, sino también por la mayor disponibilidad de su ligando fisiológico, el EC anandamida. De esta manera el tejido adiposo epididimal podría estar revelando los acontecimientos ocurridos a causa del estrés temprano en el tejido graso visceral global.

En general se plantea que si bien los procesos de adaptación del organismo animal frente a factores estresantes comprometen factores genéticos, de comportamiento, cambios hormonales y cambios metabólicos entre otros, el estudio particular del SEC aporta importantes antecedentes sobre cómo estos factores se relacionan con consecuencias fisiopatológicas a largo plazo, como sería el desarrollo de obesidad y sus alteraciones metabólicas asociadas como diabetes mellitus tipo 2, hipertensión y enfermedades cardiovasculares, entre otras, junto con destacar que cuando las condiciones adversas ocurren en los períodos críticos del desarrollo, como lo son las primeras etapas de la vida, pueden generar cambios en el fenotipo adulto, haciéndolo más susceptible a desarrollar este tipo de enfermedades.

## **11. BIBLIOGRAFÍA**

- BAKER D, PRYCE G, DAVIS WL, HILEY CD.** 2006. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 27: 1-4.
- BARKER DJ, OSMOND C.** 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1: 1077-81.
- BARKER DJ.** 1995. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 311:259-62.
- BENSAID M, GARY-BOBO M, ESCLANGON E, MAFFRAND JP, LE FUR G, OURY-DONAT F.** 2003. The cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonist SR141716 increases Acp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol.* 63:908-14.
- BERG AH, COMBS TP, SCHERER PE.** 2002. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13: 84-89.
- CADAS H, DI TOMASO E, PIOMELLI D.** 1997. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci.* 17: 1226-42.
- CIECHANOVER A.** 2005. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 79-87.
- CONSIDINE R, SINHA MK, HEIMAN ML, KRIAUCIUNAS A, STEPHENS TW, NYCE MR, OHANNESIAN JP, MARCO CC, McKEE LJ, BAUER TL.** 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334: 324-25.
- COTA D, MARSICANO G, TSCHOP M, GRUBLER Y, FLACHSKAMM C, SCHUBERT M, AUER D, YASSOURIDIS A, THONE- REINEKE C, ORTMANN S, TOMASSONI F, CERVINO C, NISOLI E, LINTHORST AC, PASQUALI R, LUTZ B, STALLA GK, PAGOTTO U.** 2003. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest.* 112(3): 423-31.
- DE FERRANTI S, MOZAFFARIAN D.** 2008. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences, *Clin Chem* 54: 945-55.
- DEUTSCH DG, UEDA N, YAMAMOTO S.** 2002. The fatty acid amide hydrolase (FAAH), *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 201-10.

**DEVANE WA, HANUS L, BREUER A, PERTWEE RG, STEVENSON LA, GRIFFIN G, GIBSON D, MANDELBAUM A, ETINGER A, MECHOULAM R.** 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptors. *Science* 258 (5090): 1946- 49.

**DI S, MALCHER-LOPES R, HALMOS KC, TASKER JG.** 2003. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* 23: 4850-57.

**DI MARZO V, GOPARAJU SK, WANG L, LIU J, BATKAI S, JARAI Z, FEZZA F, MIURA GI, PLAMITER RD, SUGIURA T, KUNOS G.** 2001. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*. 410 (6830): 822-25.

**DI MARZO V, MATÍAS I.** 2005. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat neuroscience*.8 (5): 585-89.

**DI MARZO V.** 2006. A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends Pharmacol Sci*. 27: 134-40.

**FREDERICH RC, HAMANNA A, ANDERSON S, LÖLLMANN B, LOWELL BB, FLIER JS.** 1995. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Med*. 1: 1311-14.

**FREUBIS J, TSAO TS, JAVORSCHI S, EBBETS-REED D, ERICKSON MR, YEN FT, BIHAIN BE, LODISH HF.** 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(4): 2005-10.

**FRÜHBECK G, GÓMEZ-AMBROSI J, MURUZÁBAL FJ, BURRELL MA.** 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signalling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 280: E 827-47.

**GARY-BOBO M, ELACHOURI G, SCATTON B, LE FUR G, OURY-DONAT F, BENSAID M.** 2006. The cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonist rimonabant (SR 141716) inhibits cell proliferation and increases markers of adipocyte maturation in cultured mouse 3T3 F442A preadipocytes. *Mol Pharmacol*. 69 (2): 471-78.

**GIUFFRIDA A, BELTRAMO M, PIOMELLI D.** 2001. Mechanisms of endocannabinoids inactivation: Biochemistry and Pharmacology. *J Pharmacol Exp Therap* 298: 7-14.

- GONG JP, ONAIVI ES, ISHIGURO H, LIU QR, TAGLIAFERRO PA, BRUSCO A, UHL GR.** 2006. Cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.*1071: 10-23.
- HALAAS JL, GAJIWALA KS, MAFFEI M, COHEN SL, CHAIT BT, RABINOWITZ D, LALLONE RL, BURLEY SK, FRIEDMAN JM.** 1995. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-46.
- HEID HW, MOLL R, SCHWETLICK I, RACKWITZ HR, KEENAN TW.** 1998. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res* 294: 309-21.
- HILL MN, VANESSA HO W.-S, MEIER SE, GORZALKA BB, HILLARD CJ.** 2005. Chronic corticosterone treatment increases the endocannabinoid 2- arachidonylglycerol in the rat amygdala. *Eur J Pharmacol* 528: 99-102.
- KIRKHAM TC, WILLIAMS CM, FEZZA F, DI MARZO V.** 2002. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2- arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol.* 136 (4): 550-57.
- LOFGREN P, SJOLIN E, WAHLEN K, HOFFSTEDT J.** 2007. Human adipose tissue cannabinoid receptor 1 gene expression is not related to fat cell function or adiponectin level. *J Clin Endocrinol Metab.* 92 (4): 1555-59.
- LOIZZO A, LOIZZO S, GALIETTA G, CAROLA S, SPAMPINATO S, CAMPANA G, SEGHERI G, GHIRLANDI G, FRANCONI F.** 2006. Overweight and metabolic and hormonal parameters disruption are induced in adult male mice by manipulations during lactation period. *Pediatr Res.* 59 (1): 111-15.
- LUKAS A.** 1991. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* 156: 38-50.
- MAFFEI M, HALAAS J, RAVUSSIN E, PRATLEY RE, LEE GH, ZHANG Y, FEI H, LALLONE R, RANGANATHAN S, KERN PA, FRIEDMAN JM.** 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Med.* 1: 1155-61.
- MASUZAKI H, OGAWA Y, SAGAWA N, HOSODA K, MATSUMOTO T, MISE H, NISHIMURA H.** 1997. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature Med.* 3: 1029-33.

- MATIAS I, DI MARZO V.** 2006. Endocannabinoid synthesis and degradation, and their regulation in the framework of energy balance. *J Endocrinol Invest* 29 (3 Suppl): 15-26.
- MATÍAS I, GONTHIER MP, ORLANDO P, MARTIADIS V, DE PETROCELLIS L, CERVINO C, PETROSINO S, HOAREAU L, FESTY F, PASQUALI R, ROCHE R, MAJ M, PAGOTTO V, MONTELEONE P, DI MARZO V.** 2006. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and  $\beta$ -pancreatic cells and obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 9: 3171-80.
- MATSUDA LA, LOLAITSJ, BRONWNSTEIN MJ, YOUNG AC, BONNER TI.** 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 346: 561-64.
- MOLDRICH G, WENGER T.** 2000. Localization of the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides* 21: 1735-42.
- OSEI – HYIAMAN D, DEPETRILLO M, PACHER P, LIU J, RADAIEVA S, BATKAI S, HARVEY – WHITE J, MACKIE K, OFFERTALER L, WANG L, KUNOS G.** 2005. Endocannabinoid activation at hepatic CB<sub>1</sub> receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115 (5): 1298-305.
- PAGOTTO U, MARSICANO G, COTA D, LUTZ B, PASQUALI R.** 2006. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endoc Rev.* 27: 73-100.
- PILLAI R, BHATTACHARYYA S, FILIPOWICS W.** 2007. Repression of protein synthesis by mi RNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol* 17: 118-26.
- PINTO L, CAPASSO R, DI CARLO G, IZZO AA.** 2002. Endocannabinoids and the gut. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 333-41.
- PIOMELLI D.** 2003. The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat Rev Neurosci.* 4: 873-84.
- RAVINET TRILLOU C, ARNORE M, DELGORGE C, GONALONS N, KEANE P, MAFFRAND JP, SOUBRIE P.** 2003. Anti-obesity effect of SR141716, a CB<sub>1</sub> receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 284 (2): 343-44.
- RAVINET TRILLOU C, DELGORGE C, MENET C, ARNORE M, SOUBRIE P.** 2004. CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-

induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 28 (4): 640-48.

**REINSTEIN E, CIECHANOVER A.** 2006. Narrative review: protein degradation and human diseases: the ubiquitin connection. *Ann Intern Med* 145: 676-84.

**RICE W, SHANNON JM, BURTON F, FIEDELDEY D.**1997. Expression of brain-type cannabinoid receptor (CB<sub>1</sub>) in alveolar type II cells in the lung: regulation by hydrocortisone. *Eur J Pharmacol* 327: 227-32.

**RINALDI A, VICENTI S, DE VITO F, BOZZONI I, OLIVERIO A, PRESUTTI C, FRAGAPANE P, MELE A.** 2009. Stress induces region specific alterations in micro RNAs expression in mice. *Behav Brain Res* 208: 265-69.

**RUDA MA, LING QD, HOHMANN AG, YUAN BP, TACHIBANA T.** 2000. Altered nociceptive neuronal circuits after neonatal peripheral inflammation. *Science* 289: 628-31.

**SCHWARTZ MW, SEELEY RJ, CAMPFIELD LA, BURN P, BASKIN DG.** 1996. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J. Clin. Invest.* 98: 1101-06.

**SUGIURA T, KONDO S, SUKAGAWA A, NAKANE S, SHINODA A, ITOH K, YAMASHITA A, WAKU K.** 1995. 2- arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 215 (1): 89-97.

**VAN GAAL LF, RISSANEN AM, SCHEEN AJ.** 2005. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 365:1389-97.

**WANG MY, KOYAMA K, SHIMABUKURO M, NEWGARD CB, UNGER RH.** 1998. Ob-Rb gene transfer to leptin-resistance islets reverses diabetogenic phenotype. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95: 714-18.

**WEESNER GD, MALVEN PV.** 1996. Stress stimulates mRNA for the cannabinoid receptor 1 in pig brain. *Abstracts Soc Neuroscience* 22: 2059.

**WEYER C, FUNAHASHI T, TANAKA S.** 2001. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1930-35.

**ZENOR BN, WEESNER GD, MALVEN PV.** 1999. Endocrine and other responses to acute administration of cannabinoids compounds to non-stressed male calves. *Live Sci* 65: 125-33.

**ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM, YOSHIMASA Y, TANAKA I, MORI T, NAKAO K.** 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its humans homologue. *Nature* 372: 425-32.



