



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

“FACTORES NUTRICIONALES Y ETAPAS DURANTE EL DESARROLLO QUE DESENCADENAN UNA PROGRAMACIÓN METABÓLICA EN LA RATA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:

MARÍA DEL CARMEN MIÑANA SOLIS

DIRECTOR DE TESIS: DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES.



Facultad de Medicina
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE: **“RITMOS BIOLÓGICOS Y METABOLISMO”**, EN EL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, EN LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, Y EN EL **“INSTITUT DE NEUROSCIENCES CELLULAIRES ET INTÉGRATIVES”** EN EL DÉPARTEMENT DE NEUROBIOLOGIE DES RYTHMES, DE LA UNIVERSITÉ DE STRASBOURG, EN ESTRASBURGO, FRANCIA”.

FUE FINANCIADA POR CONACYT CON EL PROYECTO N^o 43950-M, Y POR ECOS MÉXICO-FRANCIA M04S02. LAS BECAS DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS DE CONACYT Y DGEP.

En algún apartado rincón del universo centellante,
desparramado en innumerables sistemas solares,
hubo una vez un astro
en el que animales inteligentes
indentaron el conocimiento.
Fue el minuto más altanero y falaz de la “historia universal”
pero a fin de cuentas, sólo un minuto.

Friedrich Nietzsche

අ ඉපි නැත

RESUMEN

Antecedentes. La malnutrición durante la gestación y la lactancia, induce alteraciones en el crecimiento y madurez de los individuos. Esta interfiere en la organización del sistema nervioso, y en los procesos de regulación metabólica. La deficiencia nutricional en la vida temprana ha sido relacionada con la susceptibilidad a desarrollar en la edad adulta enfermedades crónico degenerativas, como hipertensión, diabetes *mellitus* tipo 2, síndrome metabólico y obesidad.

Actualmente la carencia de nutrimentos en la vida temprana, combinada con los estilos de vida sedentarios producto de la “vida moderna”, junto con la dieta basada principalmente en hidratos de carbono y las grasas, al parecer son factores importantes para que se desencadenen las enfermedades crónico degenerativas en la edad adulta.

Diversos trabajos de investigación se han enfocado en estudiar los efectos que se observan en la edad adulta debido a la malnutrición durante los periodos críticos, así como los efectos en los procesos metabólicos, de la dieta excesiva en nutrimentos o dieta de cafetería. Sin embargo, pocos trabajos han explorado las consecuencias de la malnutrición después de los periodos críticos del desarrollo, así como la posible rehabilitación con dieta balanceada.

Hipótesis. Este trabajo plantea que los individuos pueden ser vulnerables a los efectos de la malnutrición después de la gestación y la lactancia. Por ello, la carencia de nutrimentos en la dieta modificará los valores de regulación metabólica a nivel periférico y de sistema nervioso central. También el presente estudio propone que la rehabilitación nutricional con una dieta balanceada, podría revertir los efectos que se observan debidos a la malnutrición.

Diseño experimental. Para probar dichas hipótesis, se llevaron a cabo tres experimentos para los cuales se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de distintas edades y bajo dos condiciones nutricionales. Después se procedió a analizar cambios en parámetros de regulación metabólica en la periferia, la actividad neuronal hipotalámica y la expresión de proteínas clave en el balance energético, que se expresan en el hipotálamo. De esta manera nosotros podemos correlacionar a la malnutrición con alteraciones en los procesos metabólicos y funciones hipotalámicas.

Resultados.

1.- Cambios en la regulación metabólica, asociados a la malnutrición: El primer experimento tuvo como objetivo evaluar los efectos de la malnutrición y la rehabilitación nutricional balanceada, en las concentraciones plasmáticas de insulina, glucagon, glucosa, triacilglicérols, y ácidos grasos libres, después de la prueba de tolerancia a la glucosa.

Grupos experimentales. El grupo control constituido por ratas que fueron alimentadas todo el tiempo con dieta balanceada (23% de proteína); y tres grupos de ratas malnutridas con la dieta baja en proteína (6%), a tres diferentes edades. Los grupos de ratas malnutridas fueron divididos de acuerdo al periodo de su vida durante el cual se les indujo la malnutrición: malnutrición temprana (durante la gestación y la lactancia); malnutrición tardía (del destete (día posnatal 25) al día 55); y en la edad adulta del día posnatal 90 al 120. Tres grupos de ratas fueron rehabilitados con la dieta balanceada a corto y a largo plazo (día posnatal 90 y 180, respectivamente).

Resultados. La malnutrición temprana y tardía, indujeron retraso en el crecimiento que se mantuvo a largo plazo. En la edad adulta, la malnutrición produjo disminución en el peso corporal, que se recuperó con la rehabilitación. No se observó ninguna alteración

metabólica en los adultos malnutridos o posteriormente rehabilitados. Las ratas malnutridas temprana o tardíamente, mostraron hiperglucemia en comparación con sus controles nutricionales. Este efecto se no se observó después de la rehabilitación nutricional a corto o largo plazo. Las ratas malnutridas a partir del destete mostraron valores disminuidos de insulina y glucagon, que se mantuvieron después de la rehabilitación nutricional. Los triacilgliceroles se observaron disminuidos en los grupos malnutridos en la edad temprana y tardía. Después de la rehabilitación a corto o a largo plazo, sólo las ratas malnutridas a partir del destete presentaron incremento en la concentración de los triacilgliceroles y disminución de ácidos grasos libres.

2.- Efectos adversos de la malnutrición en la actividad hipotalámica: La finalidad del segundo experimento fue analizar los efectos de la malnutrición y la rehabilitación nutricional balanceada en la actividad neuronal de núcleos hipotalámicos relacionados con el balance energético.

Grupos experimentales. Se utilizaron los grupos malnutridos durante la gestación y la lactancia y del destete al día posnatal 55. Dos grupos de ratas fueron rehabilitados hasta el día posnatal 90.

Después del bolo intraperitoneal de glucosa, los cerebros de las ratas fueron procesados para inmunohistoquímica para evaluar la expresión de la proteína c-Fos, como indicador de actividad neural.

Resultados. La malnutrición temprana indujo incremento en el número de células inmunoreactivas a la proteína c-Fos en el núcleo ventromedial (VMH). Las ratas malnutridas en la etapa tardía, mostraron incremento en el núcleo arqueado (ARC) y en el VMH, así como disminución en el número de células reactivas en el núcleo paraventricular (PVN). Después de la rehabilitación nutricional el grupo malnutrido a partir del destete mostró menos neuronas inmunoreactivas en los núcleos ARC, PVN y VMH en comparación con el grupo control.

3.- Expresión alterada de neuropéptidos asociados al balance energético en el hipotálamo debido a la malnutrición. El objetivo del tercer experimento fue evaluar la expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos en núcleos hipotalámicos involucrados con el balance energético, la regulación del peso corporal y la ingesta de alimento, en ratas malnutridas y rehabilitadas.

Grupos experimentales. Se utilizaron los mismos grupos y condiciones nutricionales evaluadas en el segundo experimento.

Resultados. Las ratas malnutridos durante la gestación y la lactancia mostraron mayor densidad de fibras que expresan NPY en el ARC y en el PVN. El número de células que expresan α -MSH en el ARC se vio disminuída por efecto de la malnutrición tardía. Ambos grupos malnutridos mostraron disminuída densidad óptica de α -MSH en el PVN y DMH.

Durante el periodo de la rehabilitación nutricional, ambos grupos presentaron incremento de peso superior al de ratas control, al evaluarlo con respecto al peso corporal. También incremento en la ingesta de alimento y de tejido adiposo (abdominal, retroperitoneal y gonádico). Ambos grupos rehabilitados mostraron disminución en la densidad óptica de fibras que expresan α -MSH en el núcleo PVN. Las ratas malnutridas tardíamente y rehabilitadas mostraron la expresión de NPY aumentada en el DMH.

La expresión de orexinas en el hipotálamo lateral (LH) no se vio afectada ni por la malnutrición ni por la rehabilitación nutricional.

Conclusiones. Con estos experimentos podemos concluir que además de la gestación y la lactancia, la etapa del destete a los 55 días posnatales podría considerarse como periodo “vulnerable” a los efectos de la malnutrición, que se mantienen hasta la vida adulta. El desarrollo y los procesos de regulación metabólica en ambas etapas se ve alterado. La dieta balanceada no es suficiente para revertir los efectos de la malnutrición tardía. Además nuestro estudio sugiere que la actividad de núcleos hipotalámicos involucrados con el balance energético es blanco de la malnutrición. Es probable que la comunicación entre los órganos o señales periféricas y el hipotálamo se encuentre alterada. Esto puede originar desbalance entre el consumo, la utilización y el almacenamiento de energía. Lo cual podría relacionarse con alteraciones metabólicas y el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas en la edad adulta.

ABSTRACT

Background. Malnutrition, during gestation and lactation, induces dramatic changes in growth and maturity. It also interferes with the organization of the nervous system and the proper regulation of metabolic processes. There is evidence that nutritional deficiency, in early steps of life, is associated with higher susceptibility to develop chronic diseases in adult life, including hypertension, diabetes *mellitus* type 2, metabolic syndrome and obesity. Currently, the early nutrient deficiency combined with sedentary life styles and diets rich in carbohydrates and lipids, correlates with the high incidence of chronic diseases in the adult population. Several studies have demonstrated the adverse effects of malnutrition on adult life. A similar negative effect on adult metabolic processes had been linked to the consumption of the typical cafeteria diet. However, only few studies explored the consequences of malnutrition after critical developmental periods. Also, the restoration of metabolic processes after rehabilitation with a balanced diet has not been fully investigated.

Hypothesis. This project proposes that individuals are vulnerable to the effects of malnutrition, especially after gestation and lactation. We think that the deficiency of nutrients in the diet will modify the peripheral- and neural metabolic functions. But it is possible that nutritional rehabilitation with a balanced diet should restore the peripheral- and metabolic functions and should reverse the adverse effects of malnutrition imprinted at early steps of life.

Experimental design. In order to prove our hypothesis, we carry out three experiments with male Wistar rats of different ages, exposed to two different metabolic conditions. Then, we proceed to analyze changes in markers of metabolic regulation in the peripheral compartment, the neural hypothalamic activity and key proteins expressed in the hypothalamus that are associated to the control of energy balance. In this way, we can correlate malnutrition with the alteration of metabolic processes and hypothalamus functions.

Results.

1. – Changes in metabolic processes associated to malnutrition. The first experiment was focused to evaluate the influence of malnutrition and nutritional balance rehabilitation on the plasmatic concentrations of insulin, glucagon, glucose, triacylglycerols and free fatty acids, after glucose tolerance test.

Experimental groups. Control rats which were nourished all their life with a balanced diet (23% of protein); and three groups of malnourished rats with low protein diet (6%) at different ages. Groups of malnourished rats were categorized according to the period of life affected by malnutrition: early malnutrition (during gestation and lactation), late malnutrition (around weaning period: day 25 to day 55 after birth) and adult malnutrition (day 90 to day 120 post-natal). Three groups of rats were rehabilitated with a balanced diet after short term- and long term- malnutrition (post-natal day 90 and 180, respectively).

Results. Both, early- and late malnutrition induced a long-term growth delay, when compared with well-nourished rats. Adult malnutrition led to a decreased body weight, which reached normal values after diet rehabilitation. No metabolic alterations were detected in adult malnourished rats or adult rats receiving nutritional rehabilitation. Early and late malnutrition causes severe hyperglycemia in malnourished rats and glucose returned to normal levels after short-term and long-term, nutritional rehabilitation. Rats malnourished after weaning and even after rehabilitation displayed

low levels of insulin and glucagon. Values of triacylglycerols were low in both malnourished groups. After nutritional rehabilitation in short- or long-term, only the late malnourished rats showed an increase in triacylglycerols levels, together with a reduction in the concentration of free fatty acids.

2. - Adverse effects of malnutrition on the hypothalamic activity. The aim of the second experiment was focused to analyze the effects of malnutrition and nutritional rehabilitation on the neural activity in hypothalamic nuclei, a nervous center involved in energy balance.

Experimental groups. Rats malnourished during gestation and lactation and rats exposed to malnutrition from weaning to day 55 post-natal were used. Two groups of rats were rehabilitated after malnutrition periods until day 90 post-birth.

After injection of an intra-peritoneal glucose bolus, rat's brains were processed for immunohistochemistry. In order to detect the local production of the protein c-Fos, recognized as an indicator of neural activity.

Results. Considerable increased number of c-Fos positive cells was detected in the ventromedial nucleus (VMH) of early malnourished rats. In contrast, increased numbers of c-Fos immunoreactive cells in the arcuate nucleus (ARC) and VMH were detected in rats exposed to late malnutrition regimens. Interestingly, fewer c-Fos immuno-reactive cells were detected in the paraventricular nucleus (PVN). After nutritional rehabilitation, rats malnourished after weaning had less c-Fos immunoreactive neurons in the ARC, PVN and VMH nuclei, compared c-Fos positive cells observed in brains of control rats.

3. – Altered expression of neuropeptides associated to energy balance in the hypothalamus. The goal of the third experiment was focused to determine the changes in expression of orexigenic and anorexigenic neuropeptides in malnourished and nutritionally rehabilitated rats. These peptides are involved in energy balance, body weight regulation and food ingestion.

Experimental groups. We used the same groups and nutritional conditions utilized in the second experiment.

Results. Rats malnourished during gestation and lactation displayed a higher density of fibers that express NPY in the ARC and PVN nuclei. Reduced numbers of cells that express α -MSH were found in the ARC of rats malnourished after weaning. Both stages of malnutrition were associated with decreased expression of α -MSH by fibers in the PVN and DMH.

During the rehabilitation period, both groups showed a fast recovery of body weight. Also both groups showed an increased food ingestion and increased proportional weight of adipose tissue (abdominal, retroperitoneal and epididymal). Diet rehabilitated groups showed a decreased density of fibers that express α -MSH in the PVN. Rats malnourished after weaning and rehabilitated showed an increased expression of NPY in the DMH.

Expression of orexins in the lateral hypothalamus was not affected either by malnutrition or by nutritional rehabilitation.

Conclusions. Altogether these experiments demonstrated that besides gestation and lactation, the stage from weaning to day 55 post-natal is a “vulnerable” window for the induction of long-lasting metabolic changes than are still manifested in adult life. Development in both stages was altered, affecting the physiological regulation of metabolic processes. Nutritional rehabilitation based on a balanced diet was not enough

for reversing the detrimental effects of late malnutrition. Additionally our study suggests that the activity of the hypothalamic nuclei, which participates in maintaining an adequate energy balance, is an important target of malnutrition. It is likely that the communication between peripheral organs and signals and the hypothalamus is disrupted by malnutrition, resulting in an unbalance among the intake, spending and energy storage. This hypothalamic dysfunction caused by malnutrition seems to be related with metabolic alterations that can lead to the development of chronic degenerative diseases in adult life.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
AGL	ácidos grasos libres
ARC	núcleo arqueado del hipotálamo
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BHE	barrera hematoencefálica
BIP	bolo intraperitoneal
C	grupo control
CTG	curva de tolerancia a la glucosa
DMH	núcleo dorsomedial del hipotálamo
GK	glucocinasa
IR-	inmunoreactividad
IR-Fos	inmunoreactividad a la proteína c-Fos
LH	hipotálamo lateral
MA	grupo malnutrido en la edad adulta del día P90 al P120
MGL	grupo malnutrido durante la gestación y la lactancia
MGL-R	grupo malnutrido durante la gestación y la lactancia y rehabilitado a partir del destete (día P25) hasta el día P90
MPW	grupo malnutrido a partir del destete y hasta el día P55
MPW-R	grupo malnutrido a partir del destete y hasta el día P55 y rehabilitado hasta el día P90
NPY	neuropéptido Y
NQS	núcleo supraquiasmático
ORX	orexinas
P	posnatal

PEPCK	fosfoenol piruvato carboxicinas
PF	perifornical
POMC	proopiomelanocortinas
PTG	prueba de tolerancia a la glucosa
PVN	núcleo paraventricular del hipotálamo
TAG	triacilgliceroles
VMH	núcleo ventromedial del hipotálamo

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. Definición de nutrición, desnutrición y malnutrición	20
1.1.1. Grados de desnutrición y malnutrición	20
1.2. Etapas críticas en el desarrollo de un individuo	21
1.2.1. Teoría de los periodos vulnerables o críticos durante el desarrollo	21
1.2.2. Teoría de la “Programación”	22
1.2.3. Teoría del “Genotipo Frugal o Económico”	22
1.2.4. Teoría del “Fenotipo Frugal o Económico”	22
1.3. Relación de la malnutrición con enfermedades en la vida adulta	25
1.3.1. Estudios epidemiológicos	25
1.4. Modelos experimentales para el estudio de la malnutrición	27
1.4.1. Efectos de la malnutrición proteica	27
1.4.1.1. Efectos en el crecimiento, órganos periféricos y el metabolismo	28
1.4.1.2. Efectos en el sistema nerviosos central	29
1.5. Rehabilitación nutricional en modelos animales	31
1.5.1. Efectos en el crecimiento, órganos periféricos y el metabolismo	31
1.5.2. Efectos en el sistema nerviosos central	32
2. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA	35

3. HIPÓTESIS GENERALES	37
4. OBJETIVOS GENERALES	37
5. EXPERIMENTO 1: “EN LA RATA LA MALNUTRICIÓN PROTEICA AL DESTETE PRODUCE ALTERACIONES METABÓLICAS A CORTO Y A LARGO PLAZO, EN CONTRASTE CON LOS PERIODOS TEMPRANO Y TARDÍO”.	38
5.1. Hipótesis Específicas	38
5.2. Objetivos Específicos	38
“Post-weaning protein malnutrition in the rat produces short and long term metabolic impairment, in contrast to earlier and later periods”.	39
6. EXPERIMENTO 2: “EN RATAS MALNUTRIDAS ANTES O DESPUÉS DEL DESTETE LA INMUNOREACTIVIDAD DE FOS EN EL HIPOTÁLAMO SE VE ALTERADA DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GLUCOSA”.	55
6.1. Hipótesis Específicas	55
6.2. Objetivos Específicos	55
“Altered Fos immunoreactivity in the hypothalamus after glucose administration in pre and post-weaning malnourished rats”.	56
7. EXPERIMENTO 3: “LA MALNUTRICIÓN TEMPRANA Y AL DESTETE ALTERA LA EXPRESIÓN DE A-MSH EN EL HIPOTALAMO: POSIBLE RELACION CON LA OBESIDAD A LARGO PLAZO	71
7.1. Hipótesis Específicas	71
7.2. Objetivos Específicos	71
“Early and post-weaning malnutrition impairs α -MSH expresión in the hypothalamus: A posible link to long long-term overweight”.	72
8. DISCUSIÓN GENERAL	89

9. CONCLUSIONES GENERALES	103
10. ANEXO:	
“EFECTOS DIFERENCIALES DE UN PROTOCOLO DE RESTRICCIÓN DE ALIMENTO EN LA EXPRESIÓN DE GENES RELOJ EN EL HIPOTÁLAMO DE LA RATA”	104
<i>“Differential effects of a restricted feeding schedule on clock-gene expression in the hypothalamus of the rat”.</i>	106
11. REFERENCIAS	119
12. PUBLICACIONES	125
13.- AGRADECIMIENTOS PERSONALES	127

1. INTRODUCCIÓN

La nutrición a lo largo de la vida del individuo es una de las principales determinantes de su salud, desempeño físico y mental así como de su productividad. Actualmente la carencia de una dieta balanceada principalmente en los niños sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial que cada día cobra más vidas ([Black et al 2008](#)).

La desnutrición durante los primeros años de vida, afecta a 146 millones de niños en el mundo, de los cuales 5.6 millones mueren anualmente antes de cumplir los 5 años ([Veneman, 2006](#)).

En México, los datos aportados por la Encuesta Nacional de Nutrición en 1999 ([ENN1999](#); [Rivera-Dommarco et al 2001](#)), informaron que la prevalencia de desnutrición era de 27.5% en la población de niños menores de cinco años. La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 ([ENSANUT 2006](#); [Rivera-Dommarco et al 2006](#)), reporta que se logró reducir la cifra a 19.3%; es decir, cerca de dos millones de niños aún viven bajo condiciones precarias de alimentación.

A pesar de las estadísticas, por cada niño visiblemente desnutrido, es posible que existan otros que luchan contra la crisis nutricional que no es aparente. Teniendo graves carencias de proteínas, vitaminas, minerales esenciales, y de calorías totales, que comprometen gravemente su desarrollo físico, intelectual y emocional ([Veneman, 2006](#)).

La mala alimentación durante la gestación o durante los primeros 5 años de vida además de reducir el desempeño escolar y físico, aumenta el riesgo de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas. En la edad adulta, los niños con dieta deficiente en la vida temprana tienen mayor riesgo a padecer enfermedades crónico-degenerativas ([ENSANUT 2006](#); [Rivera-Dommarco et al 2006](#)).

A pesar de los avances tecnológicos y económicos a nivel mundial no sólo los países del tercer mundo se ven afectados por una alimentación inadecuada, también los países económicamente privilegiados sufren los efectos asociados a la vida moderna. Este nuevo estilo de vida promueve disminución en la actividad física y exceso en la ingesta de hidratos de carbono y de grasas, lo que a su vez provoca mayor frecuencia de aparición de sobrepeso y obesidad ([Amen-Ra, 2006](#); [Lieberman, 2003](#); [Solomon et al 2008](#)).

Mundialmente se ha incrementado el número de personas que padecen enfermedades como la obesidad, diabetes *mellitus* tipo 2, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, etc. En los países donde sus habitantes han sufrido o sufren desnutrición estos padecimientos son más frecuentes ([Roseboom et al 2006](#); [Schulz et al 2006](#)). Diversos estudios epidemiológicos se han enfocado a estudiar la posible correlación de dietas desbalanceadas durante la vida temprana y la propensión a padecer estas patologías, que son conocidas comúnmente como enfermedades crónico-degenerativas ([Yajnik & Deshmukh, 2008](#)). Estas enfermedades se presentan generalmente en la edad adulta sin embargo, actualmente se observa la incidencia cada vez más alta a padecerlas en edades más tempranas ([McCarthy, 2006](#)).

Diversos factores epigenéticos relacionados con la vida moderna que rodean al individuo, pueden confundir el origen puramente genético de las mismas, debido a que la etiología de estas enfermedades es complicada ([Ma et al 2007](#); [Schulz et al 2006](#)). Para comprender los mecanismos que podrían asociar la alta incidencia de enfermedades metabólicas con la mala alimentación en edades tempranas de la vida en los seres humanos, se han desarrollado modelos experimentales. En ellos se han aplicado diversos tipos de desnutrición o malnutrición, variando la cantidad o la calidad

de la dieta en diferentes etapas del desarrollo, para valorar los efectos a nivel metabólico o periférico y de sistema nervioso, a corto y a largo plazo.

1.1. Definición de nutrición, desnutrición y malnutrición

La nutrición en el ser humano está influenciada por aspectos religiosos, económicos, sociales, genéricos, geográficos, culturales y políticos. Estos modifican de manera directa o indirecta la disponibilidad, utilización y el consumo de los alimentos.

La dieta balanceada esta constituida por cantidades establecidas dentro del rango de ingesta diaria de macro y micronutrientes. La concentración depende de la edad y las necesidades energéticas de cada individuo, para que exista un balance entre el aporte y el gasto energético (Icaza & Béhar, 1981; Racotta, 2002). Dentro de los macronutrientes se encuentran los hidratos de carbono, lípidos y proteínas; mientras que los micronutrientes son los minerales, las vitaminas y las trazas de elementos (Westerterp-Plantenga *et al* 1994).

La nutrición se define como “el conjunto de procesos que incluye la ingestión, digestión, absorción, transporte y utilización de sustancias alimenticias es decir, los macro y micro nutrientes, que aseguran al organismo el desarrollo óptimo así como la integridad de todos sus mecanismos fisiológicos (Icaza & Béhar, 1981)”.

Cuando existe mala absorción o ingesta insuficiente de nutrientes, se producen alteraciones metabólicas que tienen como resultado el estado de desnutrición o de malnutrición; el cual si se prolonga puede llevar al individuo hasta la muerte (Icaza & Béhar, 1981).

La Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), ha definido a la desnutrición como “el estado patológico que surge de la ingesta inadecuada de alimentos por un periodo considerable de tiempo cuya principal manifestación es la reducción en el peso corporal (Srinivasan, 1983)”. Sin embargo Morgane *et al* en el 2002, redefinen el término **desnutrición** como la disminución en la cantidad total de alimento, el cual cuenta con todos los elementos esenciales es decir, vitaminas, proteínas, minerales, lípidos e hidratos de carbono. Mientras que la **malnutrición** la define como la dieta desbalanceada, que implica la carencia o exceso de uno o más de los elementos esenciales en la misma.

1.1.1. Grados de desnutrición y malnutrición

La ingesta de una dieta deficiente tiene como primera manifestación la disminución en el peso y la talla corporal.

La desnutrición en niños desde el punto de vista antropométrico, se clasifica basándose en el peso y talla corporal ideal con respecto a la edad (Secretaría de Salud y Asistencia; NOM-031-SSA2-1999). Esta clasificación, divide en tres grados a la desnutrición o malnutrición de la siguiente manera:

Grado leve: se tiene déficit entre el 10 y 25% por debajo de su peso ideal.

Grado moderado: déficit entre 26 y 40%.

Grado grave: con un porcentaje de 40 o más, por debajo de su peso.

Los efectos biológicos de la desnutrición y de la malnutrición usualmente se traslapan, como es el caso del Marasmo y el *Kwashiorkor*, que son los casos extremos. El

Marasmo resulta de la deficiencia predominante de calorías en la dieta. Cuando la deficiencia es leve o de corta duración, se manifiesta por simple adelgazamiento; si es grave o de larga duración, los síntomas pueden llegar a provocar estados de emaciación. El *Kwashiorkor* resulta de la dieta insuficiente de proteínas que se acompaña habitualmente de un grado variable de deficiencia calórica. Cuando la deficiencia proteínica es leve se refleja principalmente en la velocidad de crecimiento; si es intensa y prolongada se presentan cuadros clínicos con edema y otras serias alteraciones (Icaza & Béhar, 1981).

En los seres vivos las proteínas cumplen gran variedad de funciones. La carencia de proteínas en la dieta puede llevar al estado grave de malnutrición del cual el individuo es en ocasiones incapaz de recuperarse, pudiendo llegar a tener secuelas a largo plazo o incluso provocar la muerte. Las células están constituidas por proteínas, muchas de ellas funcionan como señales metabólicas, por ejemplo como hormonas (i.e. insulina, glucagon, leptina, esteroides, etc.). Las proteínas también cumplen funciones de transportadoras o receptoras, tienen efectos enzimáticos, forman parte del sistema de defensa del organismo, y en un momento dado bajo condiciones extremas, pueden servir de fuente energética (Hicks, 2001).

1.2. Etapas críticas en el desarrollo de un individuo

Durante la gestación y la lactancia se lleva a cabo un rápido crecimiento de todos los tejidos, que requiere de procesos de proliferación, migración y organización celular. Además, durante el desarrollo se establecen los niveles de regulación metabólica, también conocidos como “set-points” o puntos de regulación. Los órganos y sistemas durante estas etapas son susceptibles a ser modificados o alterados por diversos factores ambientales o epigenéticos. Estos pueden alterar sus funciones y producir secuelas a largo plazo.

Basándose en estudios epidemiológicos y con modelos experimentales, se han postulado las siguientes teorías:

1.2.1. Teoría de los periodos vulnerables o críticos durante el desarrollo

Basándose en estudios ontogenéticos, en distintas especies de animales, a partir de los años 60's se describe la existencia de la vulnerabilidad cerebral a factores teratogénicos como la dieta deficiente o excedente de nutrientes, alcohol, drogas, estrés, etc. (Dobbing, 1968). Por otro lado, Pryor en Prescott *et al* 1975; introduce el término de “periodos críticos” del desarrollo ampliándolo para otros órganos además del cerebro. Este concepto postula cuatro características:

1.- Se considera que abarca la etapa pre y perinatal.

La pubertad, por los grandes cambios asociados a la maduración endócrina, también podría a ser considerada como un “periodo crítico”.

2.- Ocurre durante un lapso de tiempo relativamente corto durante la secuencia del desarrollo; es posible que conste de horas, días, semanas o meses, dependiendo del proceso en consideración, de la especie así como de su longevidad.

3.- Un estímulo endógeno o exógeno tiene efectos a largo plazo en el desarrollo o vida subsecuente.

4.- Dicho estímulo tiene un efecto muy pequeño o no lo tiene cuando termina el “periodo crítico” de cada órgano o sistema.

1.2.2. Teoría de la “Programación”

Basándose en los efectos que produce la malnutrición durante la vida temprana, las repercusiones a largo plazo sobre el metabolismo y la propensión a padecer enfermedades metabólicas en la edad adulta, [Lucas A.](#) en 1991, planteó la teoría de la “programación”. Esta describe el proceso mediante el cual la deficiencia o desbalance alimenticio durante el “periodo crítico” se “almacena” en la “memoria” del individuo (células). Permanece a lo largo de la vida e inclusive esta “memoria” puede ser transmitida de una generación a otra. Esta “programación” además, genera el fenotipo ahorrador que a largo plazo propicia mayor acumulación de grasa, y propensión a la obesidad y enfermedades metabólicas.

A dicha teoría, años más tarde se le añadiría el término de “programación metabólica” o “programación nutricional” ([Wells, 2003](#)) (**Figura 1**). En contraste con [Lucas A., Waterland & Garza](#) en 1999, mencionan que más que “programación metabólica”, se trata de la “huella metabólica”, con la cual puede o no desencadenarse en la vida adulta alguna enfermedad metabólica. Sin embargo ambos postulados tienen en común, la teoría del “fenotipo frugal o económico”.

1.2.3. Teoría del “Genotipo Frugal o Económico”

Propuesta por [Neel](#) en 1962, inicialmente denominada como teoría del genotipo diabético. Se basó en estudios epidemiológicos en el Oeste de Norteamérica en donde se observó alta incidencia de diabetes tipo 2.

Esta teoría propone que genes “económicos” o “diabéticos”, heredados hasta nuestros días, fueron seleccionados a lo largo de la evolución del ser humano. Cuando el alimento se encontraba disponible, una vez cubiertos los requerimientos energéticos inmediatos, el excedente era almacenado en forma de grasa para ser utilizada durante los largos periodos de ayuno hasta que se contara de nuevo con más alimento. Esta condición metabólica que resultaba ser benéfica para la supervivencia durante periodos de “ayuno” (hambre) de nuestros ancestros, actualmente puede originar resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 u obesidad.

De esta manera Neel explica la relación del bajo peso al nacer y la alta incidencia a padecer diabetes en la edad adulta.

Años más adelante surge la teoría que lejos de desbancar a la del “genotipo económico” ha sido un complemento para poder explicar la relación de la carencia nutricional en la vida temprana y las enfermedades metabólicas en la vida adulta.

1.2.4. Teoría del “Fenotipo Frugal o Económico”

[Hales & Barker](#) en 1992, proponen la teoría del “fenotipo económico o frugal”, como explicación a la asociación entre la carencia de nutrientes durante desarrollo temprano

y las enfermedades en la vida adulta, principalmente diabetes tipo 2 e intolerancia a la glucosa.

Basados en la teoría de la “programación”, así como en trabajos de tolerancia a la glucosa en los Indios Pima y estudios en animales de laboratorio, se plantea que la alta eficiencia en la toma y la utilización de la glucosa mediada por la insulina, conlleva al agotamiento orgánico (páncreas, principalmente) en los individuos malnutridos o desnutridos en la vida temprana.

La teoría del “fenotipo económico” sugiere que cuando el ambiente fetal es carente de nutrimentos, existe la respuesta “adaptativa” en la cual el feto o el embrión optimizan los recursos disponibles hacia órganos como el cerebro a expensas de otros como el músculo, hígado o páncreas, dando lugar al metabolismo alterado (“económico”) en la vida posnatal. De tal manera que el sujeto queda “programado” para sobrevivir adecuadamente bajo condiciones precarias de alimentación. Sin embargo, cuando esas condiciones carentes cambian a ser las adecuadas o más abundantes estas “adaptaciones” son perjudiciales para el individuo, dando lugar al desarrollo de las enfermedades metabólicas (**Figura 1**).

Esta teoría atribuye un papel importante a los factores epigenéticos para el desarrollo de alguna enfermedad metabólica, como en el caso de los estilos de vida sedentarios. Los cuales cada día son más frecuentes en nuestras sociedades, en contraste con la vida activa a la que el ser humano estaba acostumbrado desde sus orígenes hace millones de años ([Amen-Ra, 2006](#); [Lieberman, 2003](#)).

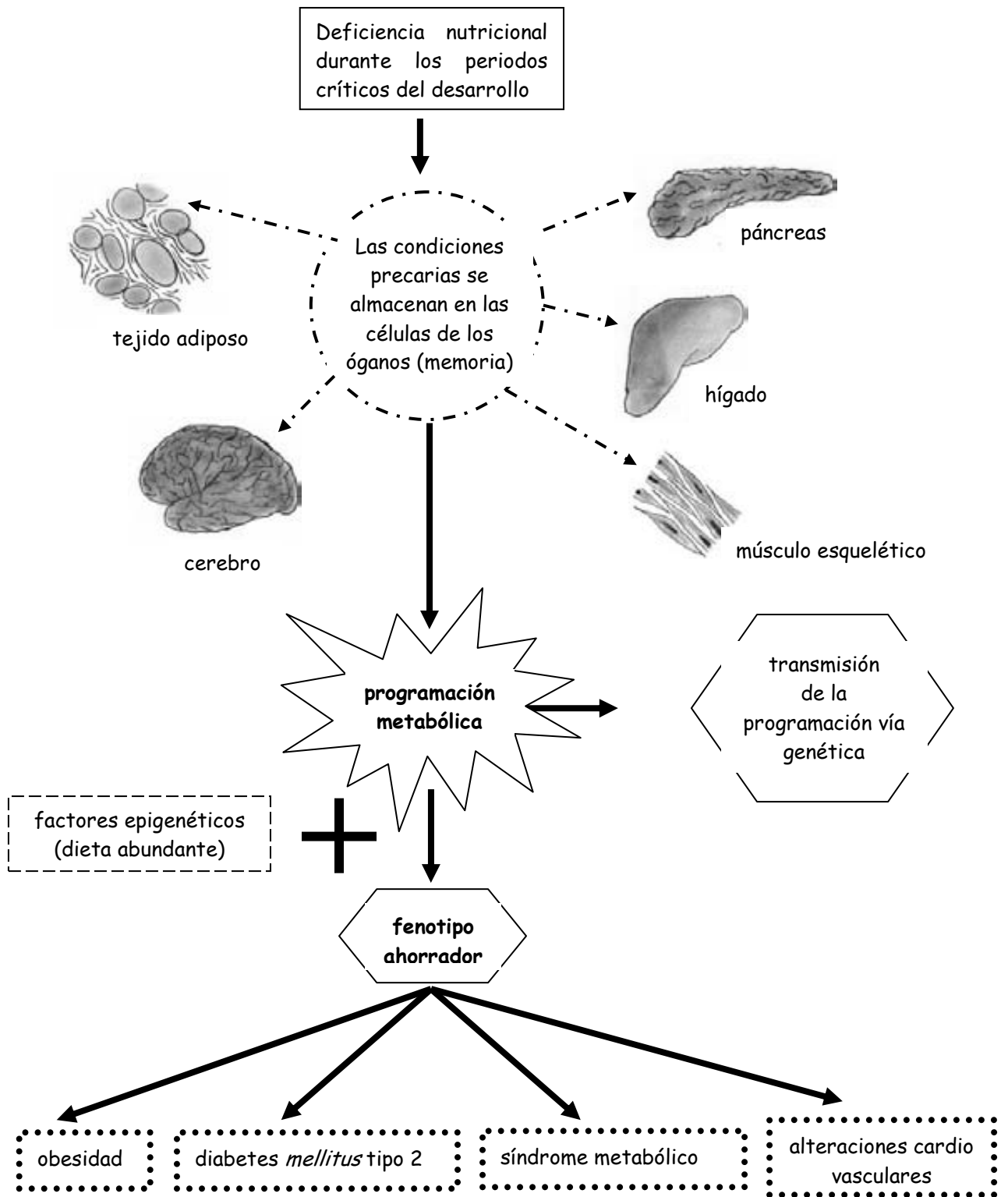


Figura 1: Esquemmatización de los efectos de la programación metabólica y el fenotipo frugal o económico y su relación con enfermedades crónico degenerativas.

1.3. Relación de la malnutrición con enfermedades en la vida adulta

Desde el punto de vista biológico, cada organismo que sobrevive y se reproduce está por definición adaptado a su ambiente. Una vez adaptado necesita tener condiciones favorables para poder llevar a cabo su ciclo de vida completo y sobrevivir como especie (Núñez-Farfán & Eguiarte, 1999). El sujeto desnutrido está adaptado sin embargo, esta condición nutricional requiere diversos ajustes tanto anatómicos como fisiológicos para poder sobrevivir en el medio restringido de nutrimentos (Waterland & Michels, 2007). Dichos ajustes que bajo condiciones precarias de alimentación le permiten la supervivencia, bajo condiciones de exceso le son desfavorables y se traducen en alteraciones metabólicas como la obesidad, diabetes *mellitus* tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, entre otras (Yajnik, 2002).

Diversos estudios tanto epidemiológicos como bajo condiciones controladas de laboratorio han investigando desde hace ya varias décadas, la correlación que se postula entre la carencia de nutrimentos en la edad temprana y las enfermedades metabólicas en la edad adulta.

1.3.1. Estudios epidemiológicos

En los años 70's en el Reino Unido, se reportan las primeras correlaciones entre el déficit nutricional en la niñez y la vulnerabilidad a padecer enfermedades coronarias en la edad adulta (Forsdahl, 1977).

Wadsworth *et al* 1985, reportaron que la presión sanguínea en la edad adulta, se relacionaba de manera inversa con el peso al nacer en hombres y mujeres nacidos en 1946. Años después, en 1987 en Hertfordshire, se realizó uno de los primeros estudios retrospectivos con individuos nacidos entre 1911 y 1930, que presentaron bajo peso al nacer y/o durante el primer año de vida. Estos sujetos padecían hipertensión o habían muerto por enfermedades cardiovasculares en la edad adulta. Este trabajo fue publicado por Barker *et al* 1989, tratando de encontrar una explicación a la alta incidencia que se presentaba de estas patologías en esa región.

Posteriormente Hales *et al* 1991, publicaron que después de realizar la prueba oral de tolerancia a la glucosa, el bajo peso al nacer, también estaba relacionado con intolerancia a la glucosa o diabetes tipo 2. Esta relación disminuía progresivamente al incrementarse el peso al nacimiento. Ambos estudios proponen que influencias adversas, en particular la nutrición pobre, actúa durante el desarrollo temprano y puede dañar permanentemente el tamaño y la estructura de los órganos y tejidos.

En la India Yajnik, 2001 y Yajnik, 2004 propone que además del bajo peso al nacer, la dieta desbalanceada durante la infancia y el cambio en el estilo de vida es el factor desencadenante de las enfermedades metabólicas. En estos estudios, se postula que la obesidad es el factor principal que influye en el desarrollo de la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2. Lo anterior debido a que la tendencia en los hindúes a acumular gran cantidad de grasa abdominal es mucho mayor que en otras razas; pero también propone que esta obesidad se puede programar in útero.

La prevalencia e incidencia más alta de resistencia a la insulina y de diabetes tipo 2 a nivel mundial, se observa en América en los indios Pima. Estos pertenecen a la comunidad que vive en el centro de Arizona, y están emparentados genéticamente con los indios que viven en el norte de nuestro país en la Sierra Madre, y que se sabe que por décadas han vivido aislados (Schulz *et al* 2006). En contraste con los habitantes de la Sierra Madre, los indios Pima residentes en EU presentan obesidad extrema,

relacionada con el exceso en la ingesta de calorías y la disminución en el gasto energético (Dabelea *et al* 1999, Schulz *et al* 2006).

Además de la influencia de la vida temprana, la dieta y la falta de ejercicio junto con los factores genéticos al parecer en los indios Pima juegan un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 (Ma *et al* 2007). Sin embargo, en esta población la contribución genética y la influencia de los factores ambientales permanece en debate (Figura 2).

Diversos factores tanto genéticos como epigenéticos interactúan e influyen en los efectos de la malnutrición temprana y en el desencadenamiento de enfermedades crónicas degenerativas en los seres humanos. Por ello, se han venido desarrollando diversos modelos en animales de laboratorio que permiten aislar diferentes variables y evaluarlas por separado.

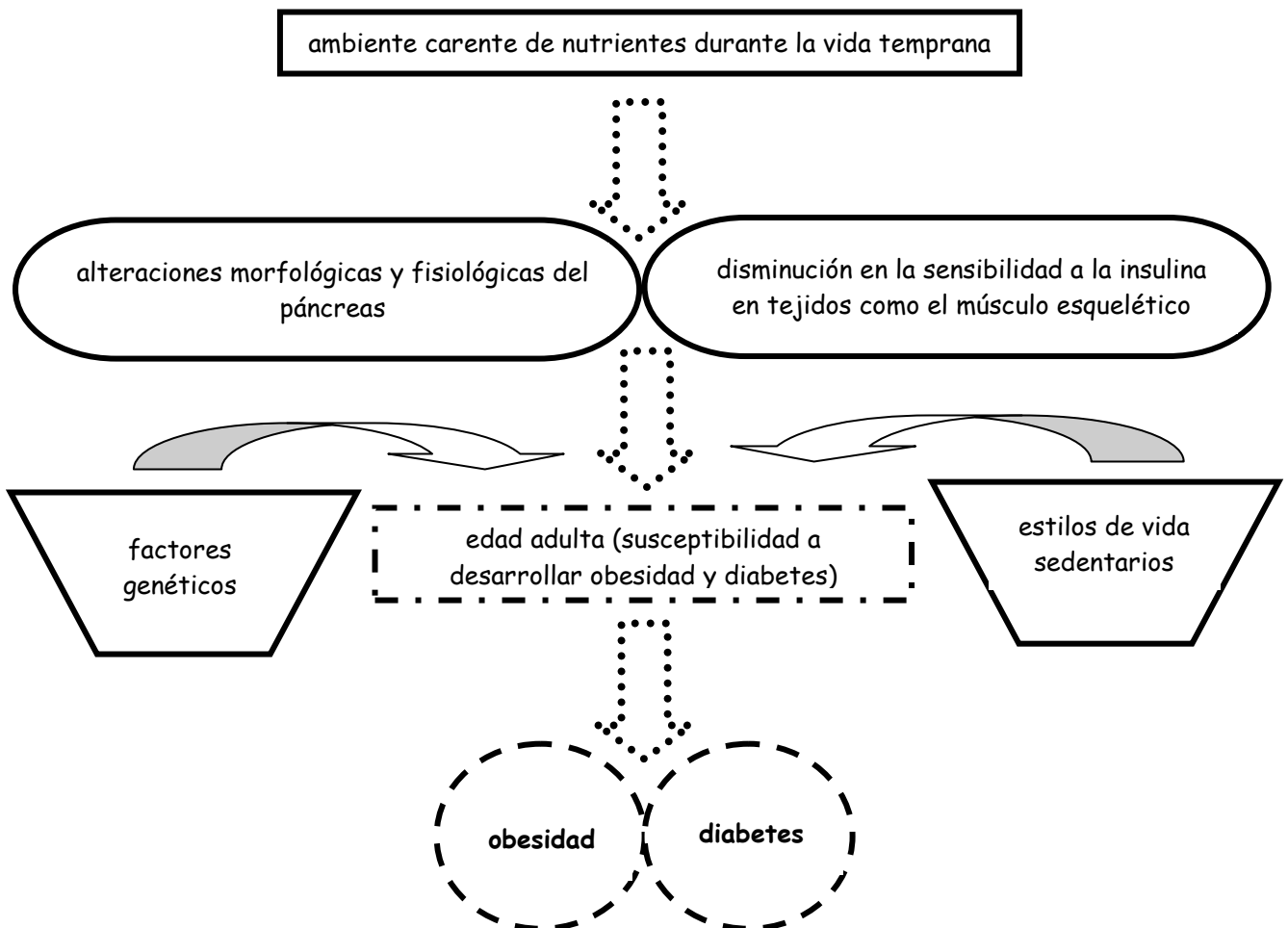


Figura 2: La influencia nutricional en la vida y factores epig enéticos que pueden desencadenar obesidad y diabetes.

1.4. Modelos experimentales para el estudio de la malnutrición

La mayoría de los conceptos básicos sobre las investigaciones nutricionales se han derivado de estudios con animales de laboratorio. Estos se mantienen bajo condiciones controladas, lo que permite observar los efectos directos de la restricción nutricional (Morgane *et al* 2002).

Los roedores han sido modelos frecuentemente utilizados para evaluar los efectos de la carencia de nutrimentos en la dieta. El denominador común en estos modelos, es la reducción en el peso corporal y en la talla lo que se conoce como el retraso en el crecimiento (McMillen & Robinson, 2005).

Las estrategias utilizadas para inducir desnutrición o malnutrición en los modelos experimentales de roedores son diversas y dependiendo de éstas, son los efectos que se obtienen. Por ejemplo, el ligamiento de la arteria uterina induce insuficiencia útero placentaria. Este reduce el aporte de nutrimentos de la madre hacia los fetos o embriones, y tiene como efecto principal el número reducido de nefronas y de glomérulos, lo cual se ha relacionado con incremento en la presión sanguínea en la edad adulta (Wlodek *et al* 2008).

La desnutrición debida a la reducción entre el 30-50% de la ingesta total de la madre durante la gestación y/o la lactancia, es otro modelo muy utilizado para el estudio principalmente de la hipertensión (McMillen & Robinson, 2005). Este modelo induce disminución en la utilización de la glucosa periférica, en el número de islotes y de células beta pancreáticas así como baja producción de insulina en los críos (Garofano *et al* 1997).

El incremento o la disminución en el número de crías de la camada durante la lactancia, es otro modelo utilizado para evaluar los efectos de la desnutrición o la malnutrición. En este modelo, el efecto más importante, es la alterada neogénesis pancreática (Garofano *et al* 1997). En él, se observa que durante la prueba de tolerancia a la glucosa, la camada con el mayor número de críos, es decir, las desnutridas, presenta tolerancia a la glucosa normal pero menor secreción de insulina en respuesta al estímulo. Lo anterior ha sugerido mayor sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos (Waterland & Garza, 2002) (Tabla 1).

La dieta baja en proteínas es frecuentemente utilizada para producir malnutrición. Este modelo induce la disminución en la proliferación y el aumento de la apoptosis de las células beta (Petrik *et al* 1999).

Los efectos que se observan debido a desnutrición o a la malnutrición, también dependen del grado, duración e intervalo de tiempo en el cual se establece la condición.

1.4.1. Efectos de la malnutrición proteica

La malnutrición en humanos tiene muchas variantes, sin embargo la prevalencia más alta entre las distintas poblaciones a nivel mundial se caracteriza, por la dieta baja en proteínas, siendo esta carencia de naturaleza crónica. La disminución en cantidad y calidad de las proteínas en la dieta, es sustituida principalmente por grasas y/o hidratos de carbono (Morgane *et al* 1978).

Como se mencionó, las proteínas son importantes para el correcto crecimiento y funcionamiento del organismo, sin embargo, cobran más importancia durante las primeras etapas del desarrollo (Snoeck *et al* 1990). Es por ello que uno de los modelos más utilizados para estudiar los efectos de la malnutrición ya sea a nivel periférico o

central durante las primeras etapas del desarrollo, es la dieta baja en proteína. Este modelo varía en cuanto al porcentaje, el tipo de proteína, la duración y la etapa durante la cual se induce la malnutrición (McMillen & Robinson, 2005; Tovar *et al* 2002).

Las dietas bajas en caseína son frecuentemente utilizadas para valorar los efectos de la malnutrición hipoproteica. Los porcentajes que se han utilizado van desde el 6% hasta el 25%, considerado este último porcentaje como la concentración normal para el desarrollo y crecimiento adecuado (Resnick *et al* 1982).

En la mayoría de los estudios se induce la malnutrición durante toda la gestación y/o toda la lactancia (Gravena *et al* 2007; Resnick *et al* 1982; Snoeck *et al* 1990) o en periodos cortos durante estas mismas etapas (Chamson-Reig *et al* 2006) (Tabla 1).

La caseína, es considerada como la mayor fuente de aminoácidos en los animales jóvenes. Esta es importante durante las etapas tempranas de desarrollo y en general en la vida del individuo, ya que promueve la absorción de calcio en los huesos, estimula la mineralización e inhibe la reabsorción de los mismos (Mardon *et al* 2008). Además la caseína constituye el mayor componente proteico de la leche que también funciona en ella como acarreadora de aminoácidos y minerales (Ginger & Grigor, 1999). Además algunos péptidos de la caseína están involucrados en la inmunomodulación (Fiat & Jollès, 1989).

1.4.1.1. Efectos en el crecimiento, órganos periféricos y el metabolismo

En general la malnutrición induce disminución en el tamaño y en el peso corporal que se conoce como un retraso en el crecimiento.

Estudios anatómicos, han demostrado que la malnutrición temprana produce en el cerebro, los pulmones, el páncreas, el hígado, el bazo, el corazón, los riñones, el timo y la masa muscular, disminución en su peso total al compararlo con los pesos de los órganos de animales alimentados con dietas balanceadas. Sin embargo, cuando el peso se evalúa con respecto al peso corporal de estos animales, el cerebro y los pulmones muestran proporcionalmente mayor peso, por lo que se han considerado como órganos protegidos de los efectos de la malnutrición temprana (Desai *et al* 1996).

A nivel metabólico, los órganos también se ven afectados de diferente manera.

La malnutrición en la rata inducida por el 6 u 8% de proteína durante las etapas tempranas de desarrollo, produce en los críos bajo peso y disminución en la talla que se mantiene hasta la vida adulta (Resnick *et al* 1982). También induce en la madre reducción en la concentración de insulina y aminoácidos circulantes y aumento en la glucosa, que repercute en baja producción de insulina en los críos (Petry *et al* 2001).

En el páncreas de ratas, la malnutrición del 8% de proteína durante la gestación y la lactancia produce tanto al nacimiento como al destete, reducción en la proliferación de células β , así como reducción en el tamaño y en la vascularización de los islotes (Snoeck *et al* 1990).

Berney *et al* 1997; demuestran que en las ratas malnutridas, ya sea durante la gestación y la lactancia o durante los dos periodos por separado, que el páncreas tiene menor número de islotes y de células beta, con respecto a sus controles. Esto semejante a lo observado por Snoeck y cols. (1990). Sin embargo, esta diferencia desaparece si los islotes y las células son evaluadas en proporción al peso corporal de los animales.

Otro efecto de la dieta baja en proteínas es el incremento en la población de células α , valores normales de glucagon en ayunas o después de alimentarse, pero disminución en la secreción de insulina con respecto a las ratas control alimentadas con dieta balanceada (Ozanne *et al* 1998).

En el hígado de ratas malnutridas, enzimas relacionadas con el metabolismo de la glucosa se encuentran alteradas. Mientras la PEPCK (fosfoenol piruvato carboxicinas), que participa en la gluconeogénesis, se encuentra incrementada, la GK (glucocinasa), que interviene en la glucólisis, se encuentra reducida. Lo anterior induce gran producción de glucosa endógena pero su utilización como fuente energética se encuentra disminuida (Burns *et al* 1997).

La malnutrición proteica en las ratas también produce disminución en la concentración plasmática de la glucosa en ayunas, mientras que los ácidos grasos libres (AGL) y el glucógeno hepático se encuentran aumentados (Latorraca *et al* 1998). Por otro lado, la concentración plasmática de triacilglicerolos (TAG), bajo dos condiciones metabólicas diferentes (ayuno o alimentación), se encuentra disminuida (Ozanne *et al* 1998) (**Tabla 1**).

Los efectos de la malnutrición proteica también se han evaluado en experimentos *in vitro* en páncreas de ratas, en los cuales se ha demostrado que al estimular la producción pancreática de insulina con arginina y leucina, ésta se ve disminuida en animales malnutridos a una edad temprana (Dahri *et al* 1991).

1.4.1.2. Efectos en el sistema nerviosos central

A pesar de que el cerebro es considerado como órgano “protegido” de los efectos de la malnutrición, existen diversos estudios que demuestran que realmente no lo está.

La mayoría de los estudios que se han realizado a nivel de sistema nervioso central se han enfocado a los efectos en áreas relacionadas con el aprendizaje o en la conducta. Por ejemplo: en ratas, estructuras cerebrales que intervienen con la respuesta al estrés (cíngulo anterior y la corteza medial prefrontal), muestran incremento en su actividad en respuesta a la inmovilidad, en un restrictor que reduce sus movimientos (Rosene *et al* 2004).

En el hipocampo incremento de las células gabaérgicas, relacionado con alteraciones de memoria y motivacionales ha sido descrito (Díaz-Cintra *et al* 2007).

Por otro lado, se ha demostrado que los animales malnutridos en la edad temprana presentan astrogliosis en la corteza, el hipocampo y el cerebelo lo cual puede estar afectando el desarrollo neuronal en estos animales (Feoli *et al* 2008).

El hipotálamo, área del cerebro que participa en la regulación central de la ingesta de alimento, el peso corporal y el metabolismo, ha sido poco estudiada en cuanto a los efectos que la malnutrición temprana puede tener ya sea a corto o a largo plazo.

Se ha demostrado que la malnutrición durante la gestación y la lactancia en las ratas, induce incremento en la producción total de neuropéptido Y (NPY), en el paraventricular (PVN), en el hipotálamo lateral (LH) y en el arqueado (ARC) (Plagemann *et al* 2000b). En contraste, al evaluar el número de neuronas inmuno positivas a NPY en el ARC, Plagemann *et al* 2000a demuestran, que estas se encuentran disminuidas. También encontraron incremento en el volumen relativo y densidad celular mayor en los núcleos ventromedial (VMH) y PVN, mientras que al parecer el LH, el arqueado (ARC) y el dorsomedial (DMH) no se ven afectados en cuanto al volumen y densidad neuronal total (**Tabla 1**).

Los estudios anteriores realizados en ratas, sugieren que estas alteraciones inducidas por la malnutrición temprana podrían originar deficiencias metabólicas, modificaciones en la ingesta de alimento y la regulación del peso corporal a largo plazo en estos animales malnutridos tempranamente.

Tabla 1: Resumen de los efectos inmediatos y a largo plazo de las deficiencias nutricionales. *El retraso en el crecimiento y la disminución del peso de órganos, son común denominador para todos los tipos de deficiencias. A largo plazo, el bajo peso y la talla, también es efecto común en los diferentes modelos (**).

Manipulación	Periodo	Efectos inmediatos	Efectos a largo plazo
Ligamiento de arteria uterina	Gestación	*Retraso en el crecimiento. *Disminución en el peso de órganos como el cerebro, hígado, páncreas, tejido adiposo, etc. Reducción en el número de neuronas y glomérulos.	**Bajo peso y talla. Hipertensión.
Reducción del total de ingesta (30-50%)	Gestación y/o lactancia	Disminución en la utilización de la glucosa periférica, en el número de islotes pancreáticos, células beta y en las secreción de insulina.	Hipertensión.
Incremento en el número de crios	Lactancia	Alteraciones en la neogénesis pancreática. Disminución en la secreción de insulina.	Alteraciones en el metabolismo de la glucosa.
Reducción en la ingesta de proteína (6-8%)	Gestación y/o lactancia	Alteraciones en enzimas hepáticas (PEPK, GK). Alteraciones lipídicas. Disminución en la vascularización del páncreas, en la proliferación de células beta; aumento en la apoptosis de células beta. Disminución en la producción de insulina. Alteraciones celulares y en la morfología cerebral.	Alteraciones en el metabolismo de la glucosa y los lípidos. Tendencia a la obesidad.

1.5. Rehabilitación nutricional en modelos animales

Para que las enfermedades metabólicas se desencadenen además de los factores genéticos, las influencias epigenéticas son de suma importancia. La dieta es uno de los principales factores epigenéticos que influyen de manera determinante.

Diversos protocolos de rehabilitación se han desarrollado con la finalidad de esclarecer hasta qué punto en el individuo se pueden revertir los efectos de la dieta desbalanceada en la edad temprana.

1.5.1. Efectos en el crecimiento, órganos periféricos y el metabolismo

[Winick et al 1968](#), demuestran que ratas recién nacidas alimentadas en camadas grandes de 18 críos durante 9 días, presentan menor peso de órganos (corazón, pulmones, hígado cerebro, riñones, bazo y timo) y el contenido de ADN y ARN disminuidos al compararlo con animales alimentados en camadas estándar (controles) de 10 críos. Al ser alimentadas a partir del día 10 y hasta el destete en camadas de 3, presentan el mismo peso y contenido celular que sus controles. Este estudio concluye que si la rehabilitación se lleva a cabo durante la vida temprana (lactancia), los efectos de la desnutrición sobre el crecimiento, peso corporal y de los órganos pueden ser revertidos. En contraste, otros estudios han informado que los efectos no se revierten ([Desai et al 1995](#); [Desai et al 1996](#); [Desai et al 1997](#)).

Otro protocolo de rehabilitación comúnmente utilizado, está basado en el método “cross-fostering” o “intercambio de madres durante la lactancia” o “intercambio materno”. El cual consiste en cambiar a partir del nacimiento a críos que fueron malnutridos con la dieta baja en proteína durante la gestación, a una hembra lactante bien alimentada. Con este paradigma el corazón los riñones y el timo muestran relación normal con respecto al peso corporal, mientras los pulmones, el cerebro, páncreas, bazo, músculo e hígado muestran reducción significativa con respecto al peso total del animal, en comparación con los controles alimentados con la dieta 20% de proteína durante la gestación y la lactancia ([Desai et al 1996](#)).

Estos datos indican que la rehabilitación nutricional induce cambios selectivos en los diferentes órganos y tejidos y que algunos no logran recuperarse a pesar de ser alimentados con dieta balanceada.

En otros estudios se ha demostrado que durante la prueba de tolerancia a la glucosa, ratas que fueron malnutridas durante la gestación y después sometidas al protocolo de intercambio materno, muestran a los tres meses de edad mayor tolerancia a la glucosa durante los primeros 30 minutos de la prueba. Sin embargo, muestran la producción de insulina disminuida en comparación con sus controles nutricionales alimentados con dieta balanceada en la edad temprana. En la edad adulta estos mismos animales durante los primeros 30 minutos de la prueba tienen menor tolerancia a la glucosa con tendencia al incremento en la producción de insulina. Con estos resultados [Hales et al 1996](#), proponen que los animales se vuelven intolerantes a la glucosa en la edad adulta.

El suministro de leptina ha sido también utilizado para inducir la rehabilitación neonatal. Ratas que fueron desnutridas con la reducción del 30% de la ingesta total durante la gestación, posteriormente fueron sometidas al intercambio materno durante la lactancia y además se les suministró una inyección de leptina diaria durante 10 días en la vida posnatal, mostraron ganancia de peso e ingesta calórica equivalente al grupo alimentado con dieta balanceada. Este protocolo de rehabilitación indujo también en las ratas que el peso del tejido adiposo, los valores de insulina y leptina fueran similares a

las ratas control (Vickers *et al* 2005). En este trabajo, se sugiere que la “programación metabólica” es potencialmente reversible durante la última fase de la plasticidad en el desarrollo (lactancia), y propone a la leptina como un agente que puede revertir los efectos prenatales de la desnutrición (Vickers *et al* 2005).

Otro protocolo frecuentemente utilizado en la rehabilitación es la administración de dietas elevadas en hidratos de carbono o en lípidos, posterior al periodo de desnutrición o malnutrición. Bieswal *et al* 2006, muestran que la malnutrición del 8% de proteína seguida de la dieta alta en hidratos de carbono hasta la vida adulta, da como resultado hiperglucemia y obesidad. Sin embargo, este mismo efecto además de hiperinsulinemia, se observa en las ratas control alimentadas con dieta balanceada en la vida temprana, y sobrealimentadas a partir del destete y hasta la vida adulta. En este estudio se concluye que el destete es una ventana temporal muy importante y sensible a los efectos de la dieta, durante la cual se puede alterar la sensibilidad y la producción de insulina, con lo que explican entonces el efecto en los animales control.

Desai *et al* en 1997, demostraron que también con la rehabilitación nutricional basada en la dieta palatable (alta en grasa y en hidratos de carbono), se tiene como consecuencia incremento en el peso corporal, aumento de los TAG y en la insulina, y modificaciones en las enzimas hepáticas en las ratas adultas. Sin embargo, también en este estudio los efectos adversos se observan tanto en el grupo control como en los malnutridos durante gestación y lactancia, lo que sugiere que el metabolismo también es susceptible a cambiar en la vida adulta.

1.5.2. Efectos en el sistema nerviosos central

Diversos modelos se han propuesto para revertir los efectos que se observan en el sistema nervioso central debido a la malnutrición o la desnutrición temprana.

Se ha encontrado que ratas desnutridas durante la gestación y la lactancia con el 50% de la dieta control, y al destete alimentadas de manera *ad libitum*, presentan disminución en la producción de leptina, y de ARNm de POMC en el ARC al compararlas con los controles a los 30 días posnatales. En contraste, el ARNm de NPY no se ve afectado con esta desnutrición (Delahaye *et al* 2008). Con el estudio anterior y otros, se ha postulado que señales periféricas neonatales como la leptina o la insulina (Delahaye *et al* 2008; Plagemann *et al* 1999), desempeñan un papel neurotrófico, promoviendo el desarrollo de los núcleos y las proyecciones hipotalámicas (Delahaye *et al* 2008; Vickers *et al* 2005). Además se ha comprobado que estas señales pueden en etapas tempranas del desarrollo revertir los efectos de la malnutrición (Vickers *et al* 2005).

Por otro lado, existen trabajos en los cuales se demuestra que la rehabilitación no logra revertir las alteraciones.

Ratas que fueron sometidas a malnutrición con dieta 6% de caseína durante la gestación, posteriormente sometidas al intercambio materno, a los 9 días posnatales, muestran el tamaño total del hipotálamo menor que en los animales control, con lo que concluyen que los animales no se rehabilitan (Kehoe *et al* 2001).

Ratas que fueron desnutridas con 70% de la dieta *ad libitum* en la gestación, durante la lactancia fueron rehabilitadas con intercambio materno, y posteriormente alimentadas *ad libitum* hasta los 4 meses de edad; presentaron tanto en condiciones de alimentación como de ayuno de 48 h, mayor concentración de leptina, además de disminución y aumento en el contenido de ARNm de NPY y de POMC respectivamente en el hipotálamo. Con los resultados obtenidos de este trabajo se sugiere que el hipotálamo

queda “programado” para controlar la ingesta de alimento y el balance energético hasta la vida adulta ([Breton *et al* 2009](#)).

2. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA

Las consecuencias de la malnutrición durante la gestación y la lactancia, a nivel periférico y de sistema nervioso central, han sido ampliamente estudiadas. En contraste, poco se sabe de los efectos de la malnutrición después estas etapas tempranas.

Los experimentos de esta tesis fueron dirigidos a demostrar que la malnutrición después de los periodos críticos del desarrollo puede inducir modificaciones en la regulación metabólica y hormonal tanto en la periferia como en el sistema nervioso central. En apoyo a esta teoría, existen algunos trabajos que demuestran que la lactancia y sobre todo el destete constituyen una ventana de tiempo vulnerable para el establecimiento de los niveles de regulación metabólica y hormonal. Así como para el control del balance energético a largo plazo tanto a nivel periférico como de sistema nervioso central (Aguayo-Mazzucato *et al* 2006; Coupé *et al* 2009; Reichling & German, 2000).

Debido a que el balance energético se lleva a cabo tanto a nivel periférico como hipotalámico, este estudio postula que al encontrar modificados los niveles metabólicos y hormonales en los animales malnutridos, es posible que estos también presenten actividad neuronal diferente a animales bien nutridos.

Se sabe que la producción de la proteína c-Fos participa en la activación de la expresión génica de otras proteínas. Esta se expresa constitutivamente en las neuronas bajo condiciones fisiológicas normales, pero también se puede inducir su expresión por señales como la depolarización de la membrana celular. Diversos estudios han demostrado que estímulos como los cambios en el metabolismo, cambios en las concentraciones de metabolitos y hormonas como la glucosa y la insulina así como el tipo de dieta que ingieren los animales inducen la expresión del gen en el sistema nervioso central (Darcel *et al* 2005; Dunn-Meynell *et al* 1997; Morgan & Curran, 1991).

Los niveles metabólicos y hormonales periféricos se ven modificados en los animales malnutridos, esto podría estar relacionado con cambios en la expresión de neuropéptidos relacionados con la ingesta de alimento. Plagemann *et al* 2000b mostraron que la malnutrición temprana modifica principalmente la secreción de los péptidos orexigénicos. Sin embargo, no se sabe cual es la respuesta de otros péptidos orexigénicos o anorexigénicos que podrían verse afectados por la malnutrición ya sea temprana o al destete. Este estudio pretende demostrar que la expresión de neuropéptidos se ve afectada y que esto podría contribuir a la desregulación del balance energético que se observa en estos animales.

Los protocolos comúnmente utilizados para inducir la rehabilitación nutricional, se basan en dietas contituídas por un exceso en el contenido de energía basada en hidratos de carbono y/o lípidos (Bieswal *et al* 2006; Desai *et al* 1997). Sin embargo, los efectos de la rehabilitación nutricional balanceada es decir, la dieta contituída por todos los micro y macroelementos en cantidad y calidad necesarias, han sido poco explorados.

Además de las dietas excesivas que se han utilizado en los protocolos de rehabilitación nutricional, el tiempo durante el cual se lleva a cabo la recuperación ha sido por periodos cortos, siendo tres meses el tiempo más largo frecuentemente utilizado (Bieswal *et al* 2006; Desai *et al* 1997). Por tal motivo, en este trabajo se propuso evaluar la rehabilitación nutricional con la dieta balanceada a corto plazo y a largo plazo, considerando el primero hasta el día posnatal 90 y el segundo al día posnatal 180.

Con base en los antecedentes, en este estudio se abordaron algunos de los efectos que la malnutrición pudiera ejercer en tres diferentes etapas de la vida de la rata: gestación/lactancia, el periodo poslactancia y la edad adulta. También se exploraron los efectos de la rehabilitación nutricional balanceada hasta los 90 y 180 días de vida posnatal. Los efectos de estas manipulaciones se abordaron en tres niveles diferentes que corresponden a los siguientes 3 experimentos:

1. Se evaluó el peso corporal así como los niveles de glucosa, TAG, AGL, glucógeno hepático, insulina, y glucagon, que pudieran indicar posibles alteraciones metabólicas.
2. Se exploró la actividad neuronal mediante la expresión de la proteína c-Fos, considerado como marcador de actividad neuronal, en núcleos hipotalámicos involucrados con el balance energético.
3. Se analizó la expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos en núcleos hipotalámicos que participan en el balance energético y la ingesta de alimento.

3. HIPÓTESIS GENERALES

En los individuos malnutridos durante cualquier etapa de su vida se observarán niveles metabólicos y hormonales diferentes a los animales alimentados balanceadamente.

La malnutrición inducirá la actividad neuronal así como la expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos diferencial, con respecto a los animales que se alimentaron con la dieta balanceada.

La rehabilitación nutricional con la dieta balanceada revertirá los efectos debidos a la malnutrición, tanto a nivel metabólico y hormonal como a nivel de sistema nervioso central en la actividad celular y en la producción de neuropéptidos.

4. OBJETIVOS GENERALES

Determinar los efectos de la malnutrición en tres etapas diferentes de la vida de la rata. A nivel periférico, evaluando el peso corporal, el peso del tejido adiposo, metabolitos y hormonas. A nivel de sistema nervioso central, explorando la actividad de núcleos hipotalámicos involucrados con el balance energético.

Evaluar los efectos de la rehabilitación nutricional balanceada a corto y a largo plazo, tanto a nivel metabólico y hormonal como a nivel de sistema nervioso central en el hipotálamo.

5. EXPERIMENTO 1:

“EN LA RATA LA MALNUTRICIÓN PROTEICA AL DESTETE PRODUCE ALTERACIONES METABÓLICAS A CORTO Y A LARGO PLAZO, EN CONTRASTE CON LOS PERIODOS TEMPRANOS Y TARDÍOS”

5.1. Hipótesis Específicas

Ratas malnutridas en tres etapas diferentes de la vida presentarán el peso corporal inferior en comparación con sus controles nutricionales alimentados con dieta balanceada.

La malnutrición en cualquier etapa de la vida modificará los niveles de regulación metabólica de glucosa, AGL, TAG, glucógeno hepático, insulina y glucagón.

La rehabilitación nutricional balanceada a largo plazo revertirá los efectos debidos a la malnutrición en el peso corporal y en los niveles de regulación metabólica y hormonal.

5.2. Objetivos Específicos

Desarrollar en ratas un modelo que permita observar los efectos de la malnutrición en el incremento de peso corporal en tres diferentes etapas de la vida.

Comprobar que la malnutrición modifica los niveles de regulación metabólica y hormonal y que la rehabilitación nutricional balanceada puede revertir dichos efectos.

“Post-weaning protein malnutrition in the rat produces short and long term metabolic impairment, in contrast to earlier and later periods”

María del Carmen Miñana-Solis and Carolina Escobar.

Int J Biol Sci. 2008, 4(6): 422-432.

ABSTRACT

Malnutrition during gestation and lactation modifies metabolic strategies and leads to metabolic disease in adult life. Studies in human populations suggest that malnutrition during infancy may also induce long term metabolic disorders.

The present study investigated if post-weaning and a late period of development might be sensitive for long term metabolic impairment. Hereto male Wistar rats were malnourished with a low protein diet (6%), during gestation and lactation (MGL), from weaning to 55 days (MPW) or during adulthood from 90 to 120 days (MA). Control rats (C) were fed with a regular diet (23% protein). We determine plasma concentrations of insulin, glucagon, triacylglycerols (TAG), free fatty acids (FFA), and liver glycogen after a Glucose Tolerance Test (GTT).

Independent of the age of onset, malnutrition induced low body weight. Early and post-weaning malnutrition produced impaired glucose tolerance and low values of TAG, also in MPW induced low values of insulin and glucagon. At 90 days, after balanced diet rehabilitation, the MGL group showed a similar glucose tolerance test as the controls but display low values of insulin, while the MPW group exhibited high levels of glucose and TAG, and low values of insulin, glucagon, FFA and hepatic glycogen. At 180 days, after balanced rehabilitation only MPW rats showed metabolic alterations. Malnutrition during adult life (MA) did not produce metabolic disturbances. Surprisingly the results uncover the post-weaning stage as a vulnerable period to malnutrition that induces long lasting metabolic alterations and deficiency in pancreatic function.

Keywords: development, critical period, nutritional rehabilitation, insulin, metabolic disease, pancreas.

INTRODUCTION

Obesity, diabetes *mellitus* type II and metabolic syndrome, are important modern life style health problems related to early malnutrition as a possible predisposing factor [1-3]. Several studies have reported that during gestation and lactation considered as a critical periods of development [4], malnutrition induces anatomical and physiological adaptations in order to allow survival in poor nutritional conditions [5-7].

Early low protein malnutrition produces a decrease of vascularization in the pancreas [8], reduced number of islets and β cells, and decrease of insulin production [9]. In the liver low protein in the diet induces a decrease in the production of glucokinase and increase in phosphoenolpyruvate carboxykinase, two enzymes involved in the glycolytic and gluconeogenic functions, respectively, resulting in a higher level of continuous endogenous glucose production by the liver [10]. Malnutrition during gestation and lactation modify the insulin sensitivity in muscle leading to impaired glucose uptake [11], while in adipose tissue early malnutrition increased number of glucose transporters and insulin receptors which promote high glucose storage [12, 13].

Also, insulin, leptin, glucagon, and metabolites like free fatty acids are modified by malnutrition [14, 15].

Such adaptations are thought to enable the organism to survive under detrimental nutritional conditions. This process is known as the “foetal programming hypothesis” [16].

Experimental and epidemiological studies have focused on the effects of early malnutrition, however recently, some studies in human populations’ postulate infancy as a vulnerable period in which malnutrition can permanently modify the metabolism and result in metabolic diseases later in life [17, 18].

The possibility of nutritional rehabilitation of foetal programming has been explored in studies performing a cross-fostered paradigm and leptin injection during lactation [19], as well as using either a balanced or hypercaloric diet [10].

Consequently, for determining with more accuracy the vulnerable period of development in the present study we investigated in rats the effects of low protein malnutrition at three different stages of life: gestation and lactation (critical period), for 30 days after weaning (day 25- 55) or in adulthood at 90 to 120 days also the effects of nutritional rehabilitation were tested on a short and a long term basis (90 and 180 days). The effects of malnutrition and rehabilitation on metabolism were determined after a glucose tolerance test (GTT) on serum metabolites and hormones. Present data show deleterious acute effects by low protein malnutrition during gestation and lactation and after weaning, but not in adult life. The effects of early malnutrition were partially reversed by the period of nutritional rehabilitation, while surprisingly nutritional rehabilitation did not reverse deleterious effects of post-weaning malnutrition indicating a vulnerable stage of development in which metabolism is permanently affected and may lead to metabolic disease in adult life.

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS AND GENERAL CONDITIONS

All animal procedures were approved by the Biosecurity and Bioethics Committee, Faculty of Medicine, UNAM, according to the Mexican Laws for Animal Care [20], which comply with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication 80-23, revised 1996). Control and malnourished offspring were born to female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) obtained from the general bioterium of the Faculty of Medicine of Universidad Nacional Autónoma de México.

Breeding females as well as the offspring after weaning were housed in groups of 3-4 animals in transparent acrylic cages (40 X 50 X 20 cm) and were maintained in a light-dark cycle 14:10 h (lights on 6:00h), with controlled temperature of 22-24°C, 40-50% humidity, food and water *ad libitum*.

NUTRITIONAL CONDITIONS

Rats were born to 3 month-old primiparous females exposed to an isocaloric (4 kcal/ g) low protein diet (6% of protein Harlan TD 92090) or to a balanced regular chow diet (23% protein Purina chow 5001). The balanced and low protein diets have been employed by previous studies and produce reproducible nutritional states [21-23].

For mating, females were exposed for one week to males (2 females and 1 male). Pregnancy was confirmed by abdominal palpation and weight increase. Date of parturition was estimated 22 days after the introduction of the males into the females’ cage. Three days before expected parturition, females were placed in individual cages

(30 X 40 X 20 cm) with sufficient wood shavings for nesting and were maintained in individual conditions until weaning (for details see Miñana and Escobar [22]). On post-natal (P) day 1, litters were standardized to 8 pups (4 females and 4 males). On day P25 litters were weaned and only males were used for all experiments according to the indicated ages and nutritional protocols.

GROUPS

Nutritional controls (C) were born from females fed the balanced diet and continued to be fed the same regular diet along their life.

Rats for the gestation and lactation malnutrition (MGL) group were born from female rats exposed to the low-protein diet for two weeks prior to mating, during gestation and lactation.

Rats for post-weaning malnutrition (MPW) group were born to females fed the balanced diet during gestation and lactation; at weaning (P25) offspring were switched to the 6% low-protein diet for 30 days until day 55 of age.

Rats for adult malnutrition (MA) group were switched to the low-protein diet at 90 days of age for 30 days.

In order to determine acute effects of malnutrition a first set of rats ($n = 7$) for each group was tested and sacrificed immediately at the end of the low protein interval: For the MGL this represented P25; for MPW at P55 and for MA at P120. A second set of rats ($n = 7$) for each malnourished group was rehabilitated by providing a balanced diet until 90 or 180 days of age in order to determine short and long term effects of nutritional recovery.

The groups and nutritional conditions are represented in **figure 1**.

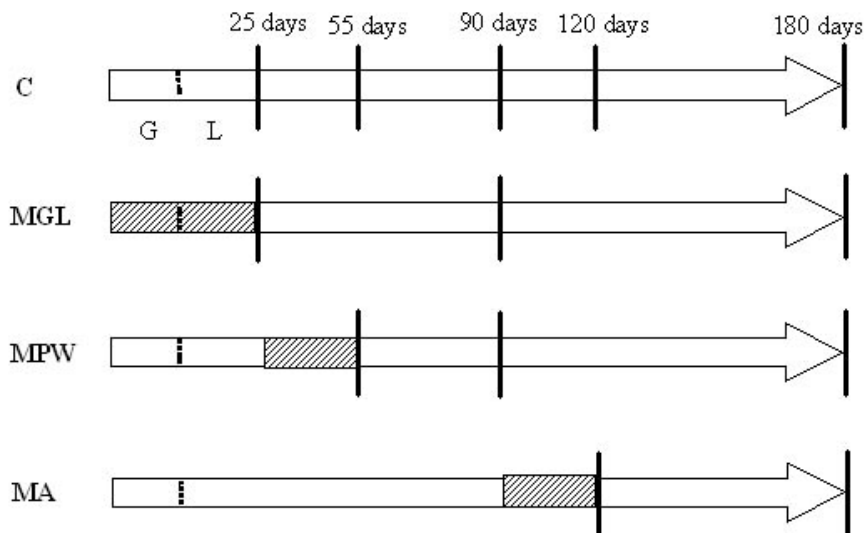


Figure 1. Schematic representation of the experimental groups. Arrows represent the life span of rats with G = gestation and L = lactation. Day of birth is indicated by the short dotted line. Striped areas represent the intervals in which rats of different groups were exposed to the 6% protein diet, while white areas represent exposure to the 23% protein balanced diet. Vertical lines represent selected ages for GTT and blood sampling.

METABOLIC DETERMINATIONS

To unmask acute effects of malnutrition, as well as short and long term effects of nutritional rehabilitation rats were tested with an oral glucose tolerance test (GTT) as described previously [24, 25]. Briefly, rats were weighed and were fasted for 16 h (food was removed the previous day at 18:00 h), between 09:30 and 10:00 h rats were anaesthetized with an intraperitoneal injection of chloral hydrate (1g/ 25mL: 1mL/ 100g) to avoid pain and stress during the GTT. This anaesthetic was chosen over others due to its minimal effects on glucose metabolism [26]. For a base line, before glucose administration, a small drop of blood was obtained from a small incision in the tail and glucose was measured with a glucometer (Ascencia ELITE of Bayer). Then, an orogastric catheter was introduced to the stomach and glucose was delivered in a concentration of 200g/ L dose 2g/ kg [25]. Following samples of blood were obtained from the same incision in the tail at 15, 30, 60 and 120 min after glucose administration. At the end of the GTT and still under anaesthesia the thoracic cavity was opened and a blood sample of 3mL was obtained from the cava vein for quantification of insulin, glucagon triacylglycerols (TAG) and free fatty acids (FFA). Also the main liver lobule was frozen at -45°C for subsequent determination of hepatic glycogen.

Blood was collected in 5mL test tubes containing a clot-forming gel (Vacutainer, Becton Dickinson) and centrifuged at 2500 rpm for 15 minutes to obtain plasma. Aliquots of 200µL were coded and frozen at -45°C for subsequent determinations. Serum insulin and glucagon were determined in duplicate with a standard ¹²⁵I radioimmunoassay kit (Diagnostic Products Corporation; TKIN1 and KGND1). For insulin assays were performed with a sensitivity of 1.2 µIU/ mL, with intra- and interassay coefficients of variation of 5.1% and 7.1% respectively. For glucagon the sensitivity was 13 pg/ mL, with intra- and interassay coefficients of variation of 3.2 and 8% respectively. TAG were determined with a standard enzymatic kit (Bayer SERA-PACK ® Plus No B-014551-0). FFA were determined with an enzymatic method according to N6v6k [27], and hepatic glycogen was assayed using 1g of tissue, according to the extracting method of Hassid and Abraham [28]. The extracted glucose was determined using a standard enzymatic kit (Hycel de M6xico No 70408).

STATISTICAL ANALYSIS

Data are reported as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Body weight along time for the three groups was analyzed with a two way ANOVA for repeated measures for the factors group and time.

Blood glucose values during the GTT are represented as absolute increase (mg/ dL) as compared to the basal value considered starting point = 0. Data were compared among groups with a two way ANOVA for the factors groups and time. ANOVA tests were followed by a *post hoc* Tukey multicomparison test with α set at $p < 0.05$. Student “t” test for independent samples were used for compared the metabolites and hormones between C and malnourished or rehabilitated groups. The statistical analysis was performed using the program Statistica (version 4.5, 1993) and graphics were elaborated using Sigma Plot 2001.

RESULTS

BODY WEIGHT

At the end of the low protein period all rats of the three groups had significantly lower body weight ($p \leq 0.04$) than their age paired controls (**fig. 2**).

On day P2 the MGL group weighed 59% and at weaning (P25) 34% of the controls' body weight (**fig. 2A**). Likewise in the MPW group after the 30 day period of malnutrition (25-55 days) the growth rate had slowed down resulting that MPW rats weighed 31% of the controls (**fig. 2B**). Adult low protein malnutrition from 90-120 days resulted in a loss of body weight leading MA rats to weigh 76% of the controls (**fig. 2C**).

In spite of short or long term balanced diet rehabilitation, the MGL and MPW malnourished groups were not able to catch up to reach the C group body weight (**fig. 2 A and B**) thus at 90 and 180 days the MGL group reached 67% and 81% of their controls' body weight, respectively ($p \leq 0.02$; **fig. 2A**) while the MPW group reached 68% and 82% at 90 and 180 days, respectively ($p \leq 0.02$; **fig. 2B**). In contrast, the MA group recovered to 93% of the C group body weight (**fig. 2C**).

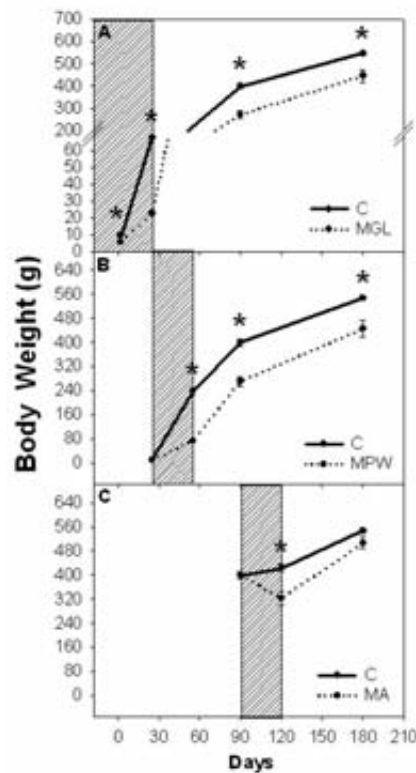


Figure 2. Body weight of **A**) rats malnourished during gestation and lactation and rehabilitated from weaning to 180 days (MGL group; $n = 7$) **B**) rats malnourished from weaning to 55 days and rehabilitated until 180 days (MPW group; $n = 7$) and **C**) rats malnourished from 90 to 120 days and rehabilitated (MA group; $n = 7$). Control rats are represented with the black continuous line, while malnourished groups are represented with dotted line. The striped box represents the malnutrition interval. Values are given as means \pm SEM. * show statistical difference ($p \leq 0.05$), only males were used for the experiment.

GLUCOSE TOLERANCE TEST

Before glucose administration MGL and MA groups displayed similar blood glucose concentrations as their C groups, while the MPW group exhibited lower concentration as their controls ($p = 0.04$; **table 1**).

After oral glucose administration Control groups showed a peak of blood glucose values between 30 to 60 minutes and thereafter values decreased to near basal levels towards the end of the GTT. In contrast 2h after glucose administration, MGL and MPW rats still exhibited high levels of glucose at the end of the GTT but only MGL rats displayed significantly high levels ($p = 0.01$; **table 1**; **figure 3 A and D**). The two way ANOVA indicated statistical difference between C and MGL ($F_{(4, 60)} = 2.59$; $p = 0.04$) and between C and MPW ($F_{(4, 60)} = 3.71$; $p = 0.009$).

The MA group displayed after malnutrition and after balanced diet rehabilitation the same GTT as their controls (**table 1** and **fig. 3G, H**).

In the MGL group, balanced diet rehabilitation reversed the response in the GTT to control levels in a short and in a long term (**table 1** and **fig. 3B and C**); however in the MPW group at 90 the response to a glucose bolus was still deficient and different from the controls ($p = 0.01$; **table 1** and **figure 3E**). ANOVA indicated statistical difference ($F_{(4, 60)} = 3.09$; $p = 0.02$). After a long term rehabilitation (180 days) the MPW rats exhibited a similar response as their controls (**figure 3F**).

Table 1. Blood glucose levels obtained before and after an oral glucose tolerance test in mg/ dL.

Groups	Acute effect		Short term		Long term	
	basal	final	basal	final	basal	final
C	82.5 ± 7.9	134 ± 10.2	80.1 ± 5.7	120.7 ± 4.6	100.7 ± 3.7	134.1 ± 10.7
MGL	63.8 ± 8.9	182.2 ± 20.9 [*]	80.4 ± 5.8	110.5 ± 6.9	98.2 ± 9.7	119 ± 10.6
C	106.7 ± 5.2	116.1 ± 12.2	80.1 ± 5.7	120.7 ± 4.6	100.7 ± 3.7	134.1 ± 10.7
MPW	55 ± 5.1 [*]	137.2 ± 21.8	84 ± 7.0	168.4 ± 10.9 [*]	93 ± 7.9	158 ± 16.8
C	92.4 ± 2.4	167.1 ± 7.6	100.7 ± 3.7	134.1 ± 10.7		
MA	93.8 ± 11.6	197.7 ± 21.9	95.4 ± 8.5	173 ± 29.2		

Values are represented ± SEM; (n = 7); ^{*} denoted differences between C and MGL or MPW groups ($p \leq 0.01$).

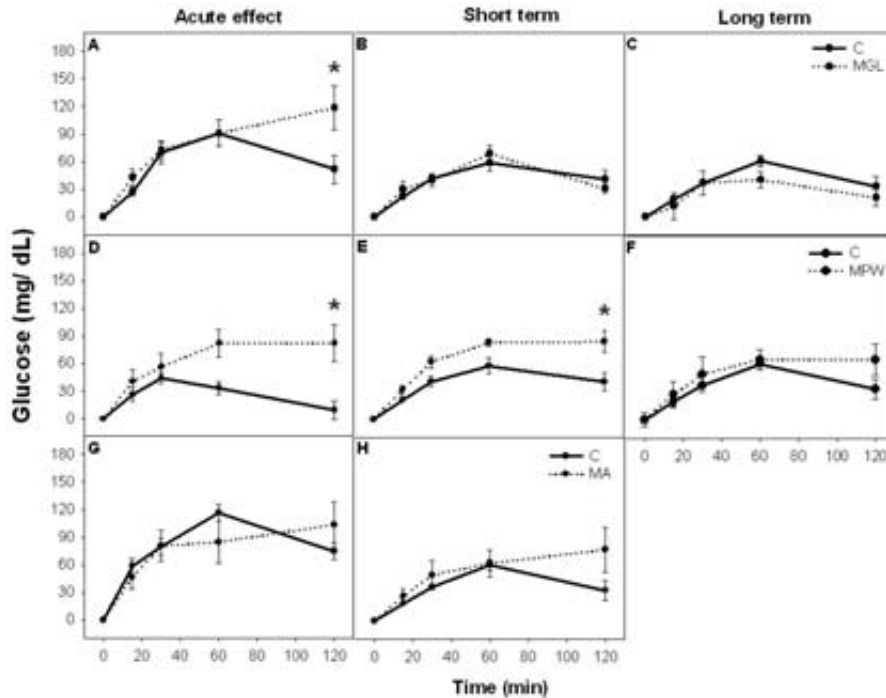


Figure 3. The absolute glucose increase (mean \pm SEM) during Glucose Tolerance Test. Left column represents groups after an acute stage of malnutrition; **A)** MGL at 25 days; **D)** MPW at 55 days and **G)** MA at 120 days. The middle column represents the GTT values after short term rehabilitation: **B)** MGL and **E)** MPW rats evaluated at 90 days and **H)** MA rats evaluated at 180 days. The right column represents the glucose values after long term rehabilitation **C)** MGL and **F)** MPW at 180 days of age. * indicates statistical difference ($p \leq 0.003$); $n = 7$ for all groups .

PLASMA DETERMINATIONS

After the GTT insulin levels were not affected in the MGL and MA groups with respect to the controls (**fig. 4 A** and **G** respectively), while the MPW rats exhibited low insulin values compared with their controls ($p = 0.001$; **fig. 4D**). After short term rehabilitation (at 90 days) both MGL and MPW groups exhibited low insulin levels as compared with their controls ($p \leq 0.001$; **fig. 4B** and **E**) and such effects persisted in the MPW group in a long term ($p = 0.001$; **fig. 4F**). MGL and MA groups did not show a difference at 180 days (**fig. 4C** and **H**).

Like wise plasma glucagon levels were not affected by early malnutrition (MGL) or by late malnutrition (MA) in the acute test or after balance rehabilitation (**fig. 5 A, B, C** and **G, H**). However, in the MPW group glucagon was significantly decreased at 55 days and was not restored after nutritional rehabilitation at 90 and 180 days (**fig. 5 D, E, F**). Student “t” test indicated statistical difference between the C and the MPW group ($p = 0.001$ for acute effects; $p = 0.03$ for short and $p = 0.001$ for long term rehabilitation).

At the end of the GTT the MGL and MPW groups exhibited low plasma concentration of TAG as compared with their controls (MGL, $p = 0.002$ and MPW, $p = 0.001$; **fig. 6 A** and **D** respectively), while malnutrition in adult life did not alter plasma TAG (**fig. 6G**). After the balanced diet rehabilitation TAG levels in the MGL and MA groups were similar to control values (see **figures 6 B, C** and **H**) while the MPW group showed short

and long term TAG alteration with significantly increased values as compared to the controls ($p = 0.02$ and $p = 0.05$, respectively; **figures 6 E, F**).

No significant effects were observed in FFA after the three different stages of malnutrition (**fig. 7A, D and G**), likewise after the interval of nutritional rehabilitation MGL and MA groups maintained similar values as their controls (**fig. 7 B, C, and G, H** respectively).

However, low FFA levels were detected in the MPW group after short and long term nutritional rehabilitation ($p = 0.03$; at 90 days and $p = 0.001$; at 180 days; **figures 7 E and F**).

The nutritional status of the rats had no effect on the hepatic glycogen levels in MGL and MA groups either under acute effects of malnutrition nor after nutritional rehabilitation periods, (**fig. 8 A, B, C and G, H**). In the MPW group hepatic glycogen was similar to the C group immediately after the malnutrition period and at 180 days (**fig 8D and F**), while at 90 days MPW rats displayed lower glycogen concentration than the C group ($p = 0.05$; **fig. 8E**).

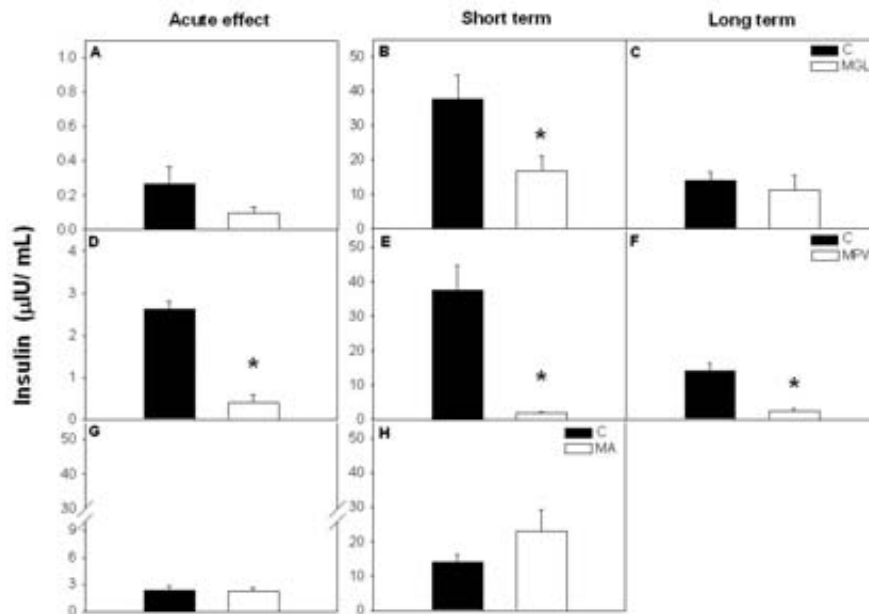


Figure 4. Plasma insulin concentration after GTT. Values are presented as mean \pm SEM; $n = 5-7$. Left panel of graphics represent the values at the end of malnutrition stage for **A)** MGL, **D)** MPW and **G)** MA groups. Central panels showed the hormone concentration after short term rehabilitation; **B)** MGL, **E)** MPW and **H)** MA groups; the right graphics represents the insulin values after long term balance rehabilitation for **C)** MGL and **F)** MPW groups. Statistical difference between the control (black bars) and the malnourished groups (white bars) is indicated * $p \leq 0.05$.

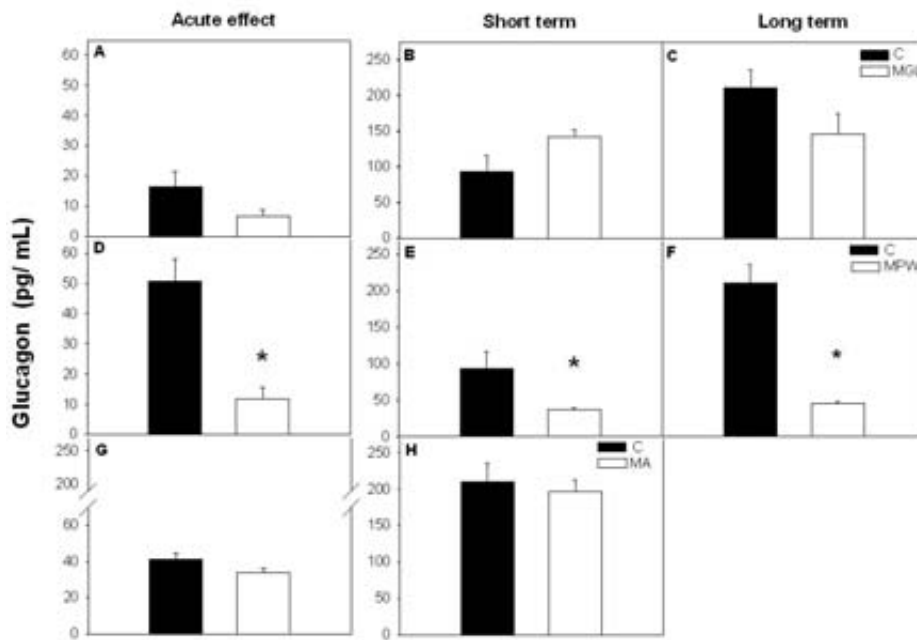


Figure 5. Mean \pm SEM of plasma glucagon concentration after GTT. Asterisk indicates statistical difference between C and MPW groups ($p \leq 0.03$; $n = 5-7$). For other indications see **Fig. 3 and 4**.

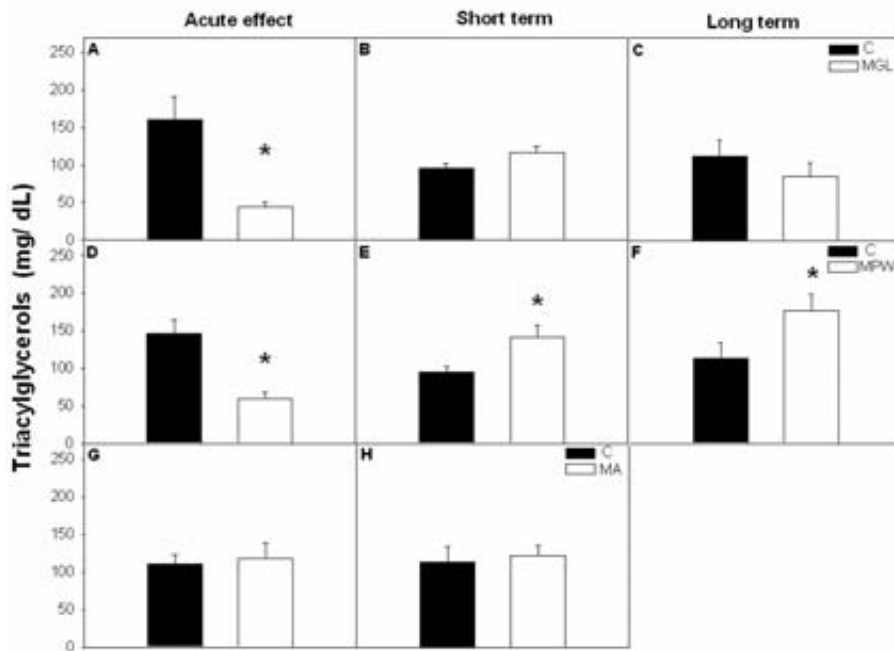


Figure 6. Plasma concentration of triacylglycerols (TAG) after GTT. Values are presented as mean \pm SEM, $n = 7$. Statistical difference between the control (black bars) and the malnourished groups (white bars) is indicated * $p \leq 0.05$. For details see **fig. 3 and 4**.

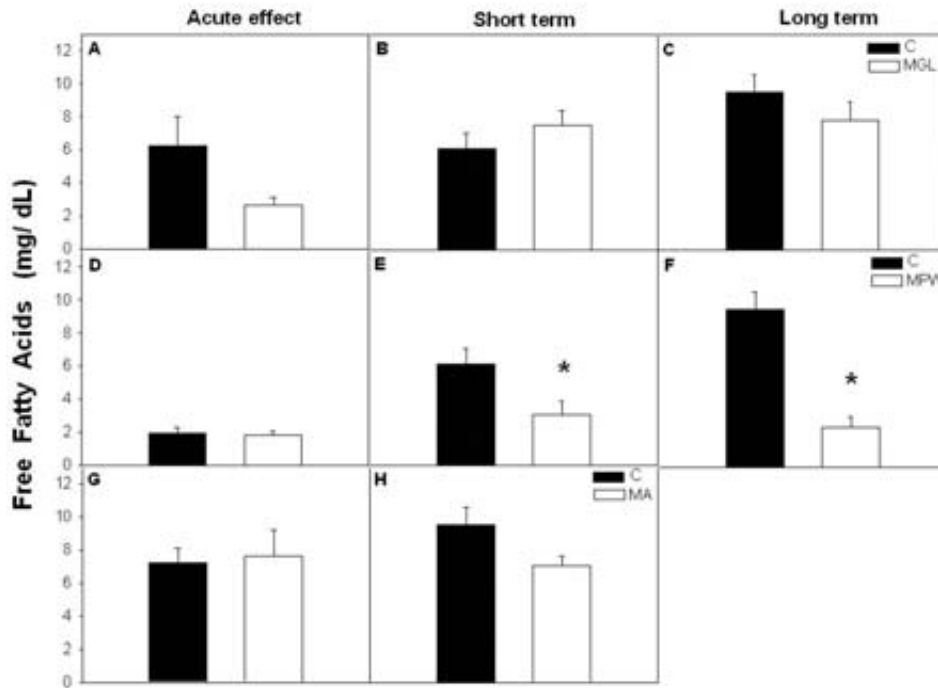


Figure 7. Plasma concentration of free fatty acids (FFA) in control and malnourished rats at the end of GTT are presented as mean \pm SEM (n = 7). Indications as in **figure 3 and 4**. Statistical difference is indicated by * $p \leq 0.03$.

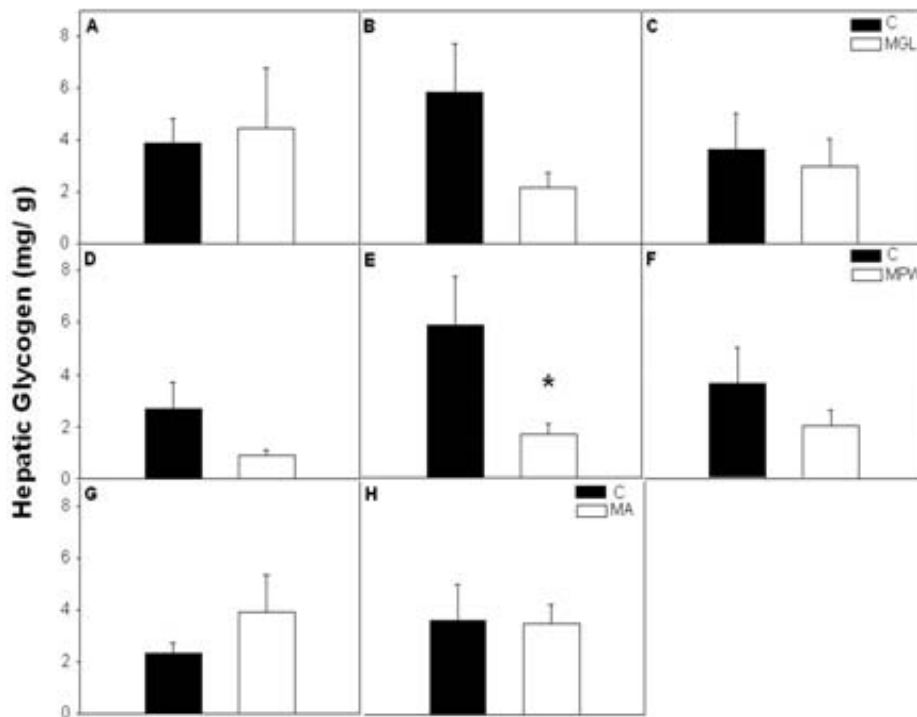


Figure 8. Hepatic glycogen concentration per gram of tissue (mean \pm SEM; n = 7) after GTT. Indications as in **Fig. 3 and 4**. * denoted statistical significance $p = 0.05$.

DISCUSSION

In the present study malnutrition during three different periods in life was compared. The results show that malnutrition early in life, mainly during the post-weaning period produces deleterious effects on the glucose tolerance test and related metabolic parameters. For the first time malnutrition during the post-weaning period is shown to be the most vulnerable period for the development of later life metabolic disturbances. These results may explain why up till now substantial controversy exists about the recovery of early malnutrition; it might be the result of slight differences in the length of the post-natal treatment period.

The present results show that malnutrition during gestation and lactation interfered with the general growth of the pups resulting in a lower body weight than their controls. These findings agree with those reported by other authors [23, 29] who have shown a similar proportion of slow growth rate and low body weight in malnourished rats compared with a well nourished control group. Interestingly malnutrition after weaning exerted a similar effect as early malnutrition leading to similar deficit of body weight. Many studies have focused on analyzing the effects of malnutrition during gestation and lactation [15, 30, 31] but have not explored the effects of protein malnutrition in later periods of accelerated growth, like the immediately post-weaning period. During this interval from weaning to 55 days, rats still undergo a fast growth spurt and our results show that during this period the young rats are most vulnerable to the effects of malnutrition. This agrees with other studies who have indicated the relevance of this interval for bone and reproductive development [32-33].

With the balanced diet rehabilitation both MGL and MPW groups were able to grow at a faster rate, however could not reach similar values as the C rats. These data are also in agreement with results from other groups indicating that early malnourished animals do not completely catch up in spite of nutritional rehabilitation [34, 35]. Adult rats exposed to malnutrition, significantly lost body weight during this interval, but were able to catch up after 30 days of rehabilitation.

Malnutrition during gestation and lactation as well as after weaning produced in a short term glucose intolerance, while malnutrition during adult life did not produce alteration in glucose metabolism in spite of 30 days of low protein diet. Such observations agree with earlier studies in malnourished animals during gestation and lactation that have reported decreased vascularization of the pancreas and number of islets of Langerhans, and reduced number of β cells which all together results in deficient secretion of insulin [8, 25, 36] especially in response to a glucose stimulus [37, 38].

After long term balanced diet rehabilitation the three experimental groups showed the same glucose response as the C groups in the GTT. Interestingly early glucose impairment observed in MGL and MPW groups were reverted by nutritional rehabilitation in spite of low insulin production at least in MPW rats. Changes in insulin sensitivity can influence plasma glucose levels as a response to a glucose administration. For example an increased sensitivity to insulin in the muscle has previously been observed by Hales *et al* [39] in early malnourished-rehabilitated rats. This can explain why the MGL and MPW groups under short and long rehabilitated periods were able to decrease the glucose levels during the GTT in spite of low insulin production, suggesting an alteration in insulin sensitivity and production, which in a long term can lead to insulin resistance, visceral obesity and diabetes.

In spite of the widely studied effects of malnutrition on β cells and insulin production by the pancreas, only a few studies have explored the effects of malnutrition on α -cells and glucagon production [40, 41]. Our present data show that early malnutrition does not

exert any affect on glucagon values however; post-weaning malnutrition decreases the glucagon levels for more than 50% compared to controls, even after short and long term nutritional rehabilitation. It is important to point out that at all three ages on acute effect of malnutrition was a low glucagon concentration as compared with the intervals when rats were rehabilitated with a balanced diet. This effect is possibly related with the age as well as with negative metabolic state associated to the low protein diet, since low glucagon levels allow energy storage and may be a relevant adaptive strategy during malnutrition [42, 43].

The most remarkable finding in this study is the severe alterations observed in the MPW rats in blood glucose, insulin and glucagon levels. This finding suggest that after weaning the pancreas is vulnerable to a nutritional insult, probably because it is still undergoing adjustments in its anatomical and functional organization. According to Fowden [44] the main phase or remodeling of the pancreas occurs around weaning (2-3 weeks of post-natal age) and is associated with a wave of islet cell apoptosis. Data obtained with the MPW group indicate the need to study the vulnerability of the pancreas and metabolic functions in later stages of development as a possible cause for metabolic diseases. The present data suggest that even after weaning pancreas islets, vascularization and β cells may be modified by a nutritional insult.

The possibilities of achieving rehabilitation after early malnutrition are controversial; one study reported that during intraperitoneal GTT malnourished-rehabilitated animals are less glucose tolerant with a tendency to higher plasma insulin concentrations than controls [39], while another study showed a normal oral GTT with a blunted insulin response [45]. Several factors may be responsible for these contradictory results: the difference in the time and type of rehabilitation, which can be provided by either a balanced or a hypercaloric diet [10]; the method for glucose administration for the GTT can influence the time of absorption, which for our study was infused orally to the stomach, while other studies have administered the glucose via intraperitoneal injection [39, 46]. Nonetheless, the present results are in agreement with Bieswal et al, [45] who found an altered response to glucose administration after an acute interval of malnutrition, but not after nutritional rehabilitation.

Malnutrition induced low levels of TAG in MGL and MPW groups, while free fatty acids were not affected by malnutrition. The fact that MPW rats show increased levels of TAG and decreased levels of FFA even after long term rehabilitation emphasizes the long term effect of MPW on many metabolic parameters. Since increased levels of TAG are also associated with diabetes type 2 and cardiovascular disease [47, 48] this observation only emphasizes the risk of late malnutrition for metabolic disease.

Previous studies have reported that early malnutrition promotes hepatic glycogen storage [49, 50] due to adaptation of hepatic enzymes [10]. In contrast we observed in general no significant changes in malnourished groups while in MPW group after short term rehabilitation showed significant low concentrations of glycogen.

In conclusion our results show that the interval after weaning is a relevant developmental period in which metabolism can be affected by malnutrition. Our results also indicate that during this period the pancreas is vulnerable for malnourishment. With the employed rehabilitation diet the induced metabolic changes by malnutrition are reversible at early stages, while they are irreversible for the period after weaning. We provide evidence that the later stage of development encompassing puberty is a vulnerable period in which severe malnutrition can lead to permanent metabolic disturbances in adult life. Such findings are relevant because they point out an additional stage in life in which diet can influence metabolism in a permanent manner, and give support to previous observations in human populations [17, 18] that indicate

infancy as the most vulnerable period that can predispose to metabolic disease similar to diabetes *mellitus* type II and metabolic syndrome.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank PhD Laura Ongay, Instituto de Fisiología Celular UNAM for support in RIA evaluations, Biol. Teresa Solis-Salazar for technical assistance and Dr. Ruud Buijs for comments and corrections of the English grammar. This work was funded by PAPIIT UNAM IN-203803 and IN-203907. MCMS received PhD fellowship by CONACyT and DGEP, posgrado en ciencias biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

REFERENCES

1. Aerts L, Van, Assche FA. Intra-uterine transmission of disease. *Placenta*. 2003; 24: 905-11.
2. Vickers MH, Brier BH, Mc Carthy D, et al. Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 285: R271-3.
3. Phillips D. Birth weight and the future development of diabetes: A review of the evidence. *Diabetes Care*. 1998; 21(2s): 150B-5B.
4. Pryor G: Malnutrition and the “critical period” hypothesis. In James W. Prescott; Merrill S Read and David B. Coursin, editor. *Brain Function and malnutrition neuropsychologic methods of assessment*, New York: John Wiley and SONS; 1975: 103-112.
5. Boxwell J, Ayson P, Ramenofsky M. Growth and metabolic parameters in pups of undernourished lactating rats. *Physiol Behav*. 1995; 57: 469-5.
6. Dabelea D, Pettitt D, Hason R, et al. Birth weight, Type 2 diabetes, and insulin resistance in Pima Indian children and young adults. *Diabetes Care*. 1999; 22: 944-0.
7. Ozanne SE, Wang CL, Petry CJ, et al. Ketosis resistance in the male offspring of protein-malnourished rat dams. *Metabolism*. 1998; 47: 1450-4.
8. Snoeck A, Remacle C, Reusens B, et al. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate*. 1990; 57: 107-8.
9. Garofano A, Czernichow P, Breant B. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia*. 1997; 40: 1231-4.
10. Desai M, Byrne Ch D, Meenan K, et al. Regulation of hepatic enzymes and insulin levels in offspring of rat dams fed a reduced-protein diet. *Am J Physiol*. 1997; 273: G899-4.
11. Holness MJ, Langdown ML, Sugden MC. Early-life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and the development to type 2 diabetes mellitus. *Biochem J*. 2000; 349: 657-5.
12. Holness MJ. Enhanced glucose uptake into adipose tissue induced by early growth restriction augments excursions in plasma leptin response evoked by changes in insulin status. *Int J Obes*. 2001; 25: 1775-1.
13. Shepherd PR, Crowther NJ, Desai M, et al. Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *Br J Nutr*. 1997; 78: 121-9.
14. Dollet JM, Beck B, Villaume Ch, et al. Progressive adaptation of the endocrine pancreas during long-term protein deficiency in rats: Effects on blood glucose homeostasis and on pancreatic insulin, glucagons and somatostatin concentrations. *J Nutr*. 1985; 115: 1581-8.
15. Latorraca MQ, Carneiro EM, Boschero AC, et al. Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increase the sensitivity to insulin in weaned rats. *Br J Nutr*. 1998; 80: 291-7.
16. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Foundation Symposium*. 1991; 156: 38-0.
17. Gonzalez-Barranco J, Ríos-Torres JM, Castillo-Martinez L, et al. Effect of malnutrition during the first year of life on adult plasma insulin and glucose tolerance. *Metabolism*. 2003; 52: 1005-1.
18. Yajnik CS. Early life origins of insulin resistance and Type 2 diabetes in India and other Asian countries. *J Nutr*. 2004; 134: 205-0.

19. Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH, Harris M. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology*. 2005; 146: 4211-6.
20. Gaceta Oficial del Distrito Federal. Decreto ley de protección a los animales del Distrito Federal, 26/02/02. 2002. Gaceta Oficial del Distrito Federal.
21. Aguilar-Roblero R, Salazar-Juarez A, Rojas-Castaneda J, et al. Organization of circadian rhythmicity and suprachiasmatic nuclei in malnourished rats. *Am J Physiol*. 1997; 273: 1321-1.
22. Miñana-Solis MC, Escobar C. Increased susceptibility to metabolic alterations in young adult females exposed to early malnutrition. *Int J Biol Sci*. 2006; 3: 12-9.
23. Resnick O, Morgane RH, Miller M. Overt and hidden forms of chronic malnutrition in the rat and their relevance to man. *Neurosci Biobehav Rev*. 1982; 6: 55-5.
24. Lopez-Soldado I, Munilla MA, Herrera E. Long-term consequences of under-nutrition during suckling on glucose tolerance and lipoprotein profile in female and male rats. *Br J Nutr*. 2006; 96: 1030-7.
25. Latorraca MQ, Reis MAB, Carneiro EM, et al. Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. *J Nutr*. 1998; 128: 1643-9.
26. Field KJ, White WJ, Lang CM. Anaesthetic effects of chloral hydrate, pentobarbitone and urethane in adult male rats. *Lab Anim*. 1993; 27: 258-9.
27. N6v6k M. Colorimetric ultramicro method for the determination of free fatty acids. *J Lipid Res*. 1965; 6: 431-3.
28. Hassid WZ, Abraham S: Chemical procedures for analysis of polysaccharides. In Colowick and C Kaplan, editor. *Methods in enzymology*, vol 3. New York; 1957: 34-50.
29. Marin MC, Se Tom6s ME, Serres C, et al. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. *J Nutr*. 1994; 125: 1017-4.
30. Gamallo JGT, Perry MLS, Trindade VMT, et al. Effect of pre-and postnatal protein undernutrition on glycemia, ketonemia and liver glycogen concentration in suckling rats. *Ann Nutr Metab*. 1989; 33: 266-0.
31. Rees WD, Hay SM, Brown DS, et al. Maternal protein deficiency causes hypermethylation of DNA in the livers of rat fetuses. *J Nutr*. 2000; 130: 1821-6.
32. Pucciarelli HM, Goya RG. Effects of post-weaning malnutrition on the weight of the head components in rats. *Acta Anat*. 1983; 115: 231-7.
33. Reichling TD, German RZ. Bones, muscles and visceral organs of protein-malnourished rats (*Rattus norvegicus*) grow more slowly but for longer durations to reach normal final size. *J Nutr*. 2000; 130: 2326-2.
34. Holness MJ. Impact of early growth retardation on glucoregulatory control and insulin action in mature rats. *Am J Physiol*. 1996; 270: E946-4.
35. Ozanne SE, Wang CL, Coleman N, et al. Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *Am J Physiol*. 1996; 271: E1128-4.
36. Martin JF, Johnson CS, Han CT, et al. Nutritional origins of insulin resistance: A rat model for diabetes-prone human populations. *J Nutr*. 2000; 130: 741-4.
37. Bertin E, Gangnerau MN, Bellon G, et al. Development of beta-cell mass in fetuses of rats deprived of protein and/or energy in last trimester of pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002; 283: R623-0.
38. Blondeau B, Avril I, Duchene B, et al. Endocrine pancreas development is altered in foetuses from rats previously showing intra-uterine growth retardation in response to malnutrition. *Diabetologia*. 2002; 43: 394-1.
39. Hales CN, Desai M, Ozanne SE, et al. Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem Soc Trans*. 1996; 24: 341-0.
40. Alvarez E, Fern6ndez S, Blazquez E. Effect of maternal food restriction on circulating insulin and glucagon levels and on liver insulin and glucagon binding sites of fetal and suckling rats. *Diabete Metab*. 1986; 12: 123-2.
41. Berney DM, Desai M, Palmer DJ, et al. The effects of maternal protein deprivation on the fetal rat pancreas: major structural changes and their recuperation. *J Pathol*. 1997; 183: 109-5.
42. Navarro-Tableros V, Fiordelisio T, Hern6ndez-Cruz A, et al. Physiological development of insulin, calcium channels, and GLUT2 expression of the pancreatic rat beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 292: E1018-1029.
43. Tovar AR, Ascencio C, Torres N. Soy protein, casein, and zein regulate histidase gene expression by modulating serum glucagon. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002; 283: E1016-1022.

44. Fowden AL, Hill DJ. Intra-uterine programming of the endocrine pancreas. *Br Med Bull.* 2001; 60: 123-2.
45. Bieswal F, Ahn MT, Reusens B, et al. The importance of catch-up after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity.* 2006; 14: 1330-3.
46. Picarel-Blanchot F, Alvarez C, Bailbe D, et al. Changes in insulin action and insulin secretion in the rat after dietary restriction early in life: Influence of food restriction versus low-protein food restriction. *Metabolism.* 1995; 44: 1519-6.
47. Holness MJ, Fryer LG, Priestman DA, Sugden MC. Moderate protein restriction during pregnancy modifies the regulation of triacylglycerol turnover and leads to dysregulation of insulin's anti-lipolytic action. *Mol Cell Endocrinol.* 1998; 142: 25-3.
48. Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res.* 2005; 36: 232-0.
49. Claeysens S, Lavoine A, Vaillant C, et al. Metabolic changes during early starvation in rats fed a low-protein diet in the postweaning growth period. *Metabolism.* 1992; 41: 722-7.
50. Gosby AK, Maloney ChA, Phuyal JL, et al. Maternal protein restriction increases hepatic glycogen storage in young rats. *Pediatric Research.* 2003; 54: 413-8.

6. EXPERIMENTO 2:

“EN RATAS MALNUTRIDAS ANTES O DESPUÉS DEL DESTETE LA INMUNOREACTIVIDAD DE FOS EN EL HIPOTÁLAMO SE VE ALTERADA DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GLUCOSA”.

6.1. Hipótesis Específicas

La malnutrición inducirá la actividad neuronal diferencial en núcleos hipotalámicos involucrados con el balance energético con respecto de animales alimentados con dieta balanceada.

La rehabilitación nutricional balanceada a corto plazo inducirá la respuesta neuronal similar a los controles nutricionales en animales previamente malnutridos.

6.2. Objetivos Específicos

Determinar los efectos de la malnutrición en dos edades diferentes de la rata, en la actividad neuronal de algunos núcleos hipotalámicos involucrados con el balance energético y la ingesta de alimento.

Observar los efectos de la rehabilitación nutricional balanceada a corto plazo, sobre la actividad neuronal de núcleos hipotalámicos en ratas previamente malnutridas.

“Altered Fos immunoreactivity in the hypothalamus after glucose administration in pre and post-weaning malnourished rats”.

María del Carmen Miñana-Solis, Ángeles-Castellanos M, Ruud Buijs and Carolina Escobar.

Nutrition Neuroscience (aceptado) 2009.

ABSTRACT

The present study explored the effects of malnutrition and nutritional rehabilitation on the response to glucose in hypothalamic nuclei involved in metabolic homeostasis.

Male Wistar rats were malnourished during gestation-lactation (MGL) or at weaning to 55 days (MPW). Two groups of rats were rehabilitated with a balanced diet until 90 days (MGL-R and MPW-R, respectively). After a glucose tolerance test (GTT) brains were processed for Fos immunoreactivity (Fos-IR). Both malnourished groups displayed hyperglycemia after GTT. MGL exhibited an increased number of Fos-IR neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH), while MPW showed increased Fos-IR in the arcuate nucleus (ARC) and VMH and a decreased in the paraventricular nucleus (PVN), as compared with their controls. Nutritional rehabilitation normalized values of glucose after GTT in both groups, while low number of Fos-IR neurons remained in the ARC, PVN and VMH of MPW-R rats, indicating a deleterious long lasting effect after post-weaning malnutrition.

Key words: malnutrition, energy balance, hypothalamus, metabolic impairment, glucose

1. INTRODUCTION

Early malnutrition affects a large percentage of infants in developing countries¹. A wide range of experimental studies with rodents demonstrate that malnutrition during gestation and lactation leads to decreased body weight and selective alterations on organs' growth². It also imprints metabolic systems in order to adapt to a nutritional deficient environment, by modifying the production of liver enzymes³, the sensitivity to insulin in the skeletal muscle and glucose transporters mainly GLUT 1 and GLUT 4⁴. Furthermore, early malnutrition decreases vascularization and the number of β cells in the pancreas⁵ and increases the concentration of insulin receptors in adipose tissue⁶ resulting in an increased peripheral insulin sensitivity. Such adaptations lead in adulthood glucose intolerance⁷, metabolic disease like obesity, hypertension and diabetes *mellitus* type 2⁸. We have recently reported that malnutrition during gestation and lactation as well as at weaning to 55 days, results in glucose intolerance as determined with a glucose tolerance test (GTT) leading to important long lasting alterations in metabolic balance⁹.

Glucose is the most important fuel for the body and especially for the brain since it is the primary fuel¹⁰. The brain needs to react to changes in blood glucose concentration in order to induce compensatory reactions in the periphery to maintain glucose homeostasis¹¹. Glucose balance depends on the interaction of several organs like brain, liver, pancreas, adipose tissue and muscle. The hypothalamus plays an important role in regulating food intake and glucose production, it also coordinates the function of peripheral tissues to maintain energy balance¹². Glucosensitive and glucoresponsive neurons are present in hypothalamic nuclei and promote glucose homeostasis through

autonomic pathways to control secretion of pancreatic hormones, endogenous glucose production by the liver and energy expenditure^{12,13,14}. Other metabolic signals like insulin¹⁵ and leptin¹⁶ are also monitored in the hypothalamus in order to maintain energy homeostasis.

The arcuate nucleus (ARC), the paraventricular (PVN), ventromedial (VMH), dorsomedial nucleus (DMH), and lateral area (LHA) are hypothalamic structures that have shown to respond to changes in blood glucose and constitute the functional circuits to control energy balance¹⁷. For many years it has been known that neurons within the hypothalamus change their activity in response to changing levels of blood glucose¹¹. Other studies have shown the neuronal activation of hypothalamic nuclei to glucose infusion with the detection of the Fos protein, which is used as marker of neuronal activity. The number of Fos positive neurons in response to acute physiological or chemical manipulation, reaches peak values 90 min after stimulus¹⁸. After intra-carotid glucose injection Dunn-Meynell *et al*¹⁹ described increased number of Fos immunoreactive neurons in the PVN and VMH, and Guillod-Maximin *et al*²⁰ found increased number of Fos positive cells in the ARC and PVN in rats, significantly different from an infusion of 0.9% saline.

Malnutrition during gestation and lactation impacts directly on the developing brain, delaying cellular proliferation and disturbing migration processes^{21,22}. Early malnutrition also has been suggested to disturb the developing hypothalamus inducing in a long term, decrease of neuronal density in the suprachiasmatic nucleus^{23,24}, and in a short term decreased glia/neuron ratio in the periventricular area and decrease of NPY (neuropeptide Y) and galanin production in the ARC nucleus²⁵. These findings indicate that the hypothalamus is vulnerable to malnutrition during critical stages of development. In addition due to their relevant role for glucose homeostasis, it is possible that hypothalamic nuclei will modify their response to glucose signal in order to enable malnourished organisms to maintain energy balance under critical nutritional conditions as observed in the pancreas and liver.

Consequently in order to uncover possible changed hypothalamic strategies for glucose sensing after malnutrition and rehabilitation, we compared the number of Fos immunoreactive neurons in the perifornical area (PeF), ARC, DMH, PVN and VMH nuclei after an intra-peritoneal glucose bolus (IPB) as employed for a GTT. We hypothesized that rats malnourished during gestation and lactation or from weaning to 55 days would exhibit a different Fos response in hypothalamic neurons after an intra-peritoneal glucose bolus as compared with their well nourished controls, while rehabilitated rats at 90 days would exhibit a reversion of deleterious effects due to malnutrition.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Subjects and general conditions

Wistar rats *Rattus norvegicus* bred at the Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, (UNAM) were used. Adult and post-weaning rats were housed in groups of 4 animals in acrylic cages and were maintained in a light-dark cycle 14:10 h (lights on 6:00h), with controlled temperature of 22-24°C, 40-50% humidity, with food and water *ad libitum*. The experimental procedures were approved by the Biosecurity and Bioethics Committee, Faculty of Medicine, UNAM, in strict accordance with the Mexican norms for animal handling Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999,

which conforms to international guidelines for animal handling. All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

2.2 Nutritional conditions

Male rats used in all experiments were born to 3 month-old primiparous females exposed either to chow standard feeding (Purina, USA) or an isocaloric low-protein diet (6% casein; Teklad, Harlan TD 92090) at the indicated ages. The low-protein and regular diets used for this study have been used previously by our group and others to induce severe low protein malnutrition or a well nourished control condition^{21, 26, 27}.

Reproductive units were formed with one male and two females. On postnatal (P) day 1, litters were standardized to 8 pups (4 males and 4 females), which were immediately weighed. For more details for mating, litter standardization and weaning see reference²⁶.

Rats were assigned to one of three groups according to their nutritional conditions:

Nutritional controls (C) were rats born from females that were always fed a balanced standard diet and pups were maintained in the same diet along life.

Gestation and Lactation malnourished rats (MGL) were born to females exposed to a low protein diet for two weeks previous to mating, during gestation and lactation up to P25.

Post-weaning malnourished rats (MPW) were born to females exposed to a chow standard diet during gestation and lactation, at weaning (P25) pups were switched to a 6% low protein diet for 30 days, thus until P55.

Two rehabilitated groups were formed whereby one set of MGL and MPW rats and were switched to a standard chow diet until P90: MGL-R and MPW-R, respectively.

2.3 Intraperitoneal glucose bolus (IPB) and perfusion

MGL and MPW rats at P25 and P55 respectively, nutritional rehabilitated groups (MGL-R and MPW-R) at P90 and their corresponding controls were first exposed to an intra-peritoneal glucose bolus as performed for a GTT (n = 4 per group). At the indicated ages rats were weighed and fasted for 16 h (food was removed at 18:00 h). The next day at 10:00 h rats received an intra-peritoneal glucose injection (0.9% saline with glucose 1g/ 10mL) in a dose of 1g/ kg body weight.

Following a protocol of GTT, two hours after glucose injection rats were anaesthetized with an overdose of pentobarbital (Sedal-Vet 65), previous to perfusion and under anesthesia blood glucose from the heart auricle was determined with a glucometer (Ascencia ELITE of Bayer) as described in other studies^{28,29}, it is important to point out that the dynamic of energy balance under anesthesia is modified^{30,31} as compared from awake rats, however it allowed to insure a similar metabolic condition for all rats. Immediately rats were perfused transcatheterially with 200 mL of saline (0.9%) followed by 200 mL of paraformaldehyde (4%) in phosphate buffer saline (PBS 0.1M, pH 7.2). The brains were removed, post-fixed for 1 day, and cryoprotected in 10, 20 and 30% sucrose in a buffer phosphate saline (0.9%; PBS) solution. Frozen (-18°C) coronal sections of 40µm were cut with a cryostat at the level of the hypothalamus. Sections were serially collected in four sets of which 1 set was used for this study.

2.4 Immunohistochemistry

Free floating sections were incubated for 48 h at 4° C in Fos antibody raised in rabbit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:2500 in buffer phosphate saline (0.9%; PBS); 1% goat serum and 0.3% Triton X-100 (PBSGT). Following incubation in the primary antibody, sections were rinsed three times for 10 min in PBS, and were incubated 2 h at room temperature in biotinylated secondary antibody IgG

(anti-rabbit made in goat; Vector Laboratories) 1:200 in PBSGT. Two hours later and after three rinses of 10 min each, tissues were incubated for 2h at room temperature in avidin-biotin-peroxidase complex (0.9% avidin and 0.9% biotin solutions; Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratories) diluted in PBSGT.

Finally, tissue sections were rinsed again three times for 10 min in PBS and were reacted with 3, 3' diaminobenzidine (DAB; Sigma. 0.05 mg/mL, in Tris buffer PBS pH 7.2) as the chromogen, with hydrogen peroxide (35 μ L/ 50 ml, 30% H₂O₂). Sections were then mounted on gelatin-coated slides, and dehydrated through a series of alcohols (70, 90, 96, 100%), cleared with xylene and coverslipped with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

2.5 Quantification of Fos positive cells

The number of Fos immunoreactive neurons (Fos-IR) was counted bilaterally in two representative coronal sections (anterior and posterior regions) (n = 4 per group) for each nucleus according with the stereotaxic atlas³². For the PVN sections selected correspond to Bregma -1.60 and -1.88; for the ARC, DMH, VMH nuclei and PeF area sections correspond to Bregma -2.30 and -3.30. Images were examined under a light microscope (Nikon, Elipse E600) and captured at a 10X magnification using a computerized image analysis system (Meta Vue series 4.5; Universal Imaging Corporation).

The number of Fos-IR cells was counted at a 10X magnification with a semi-automatic system. In order to minimize the number of false positives, background optical density (OD) was established in a nearby region lacking Fos expression. An observer blind to the rats' nutritional conditions counted the Fos-IR neurons reaching or surpassing three times the OD background, whereas cells under this staining threshold were discarded. Total number of Fos-IR neurons for the two representative sections were averaged per group.

2.6 Statistical analysis

Body weight, blood glucose concentrations and number of Fos-IR neurons were classified for group and age and reported as mean \pm standard error of the mean (sem). Student's t-test for independent samples was used to compare the controls vs malnourished rats at P25 and at P55. A one way ANOVA was used to compare control vs two rehabilitated groups at P90 days, followed by a *post hoc* Tukey multicomparison test with α set at $p < 0.05$. The statistical analysis was performed using the program Statistica (version 4.5, 1993) and graphics were elaborated using Sigma Plot 2001.

3. RESULTS

3.1 Body weight and blood glucose concentration after IPB

Low protein diet during gestation and lactation or from weaning to P55 resulted in significantly low body weight gain compared with the well nourished C groups. At the end of the acute period of malnutrition the MGL and MPW rats weighed 42% and 28% of their respective C groups ($p < 0.001$). At P90, the MGL-R and MPW-R rats still maintained low body weight compared with the C group. The one way ANOVA indicated the statistical difference ($F_{(2,9)} = 25.27$; $p = 0.0002$) (**Table 1**).

Two hours after the glucose load, both malnourished groups (MGL and MPW) exhibited high values of blood glucose as compared to their controls ($p \leq 0.001$) while

rats exposed to nutritional rehabilitation MGL-R and MPW-R showed similar blood glucose values as the control group ($F_{(2,9)} = 0.89$; $p = \text{NS}$) (**Table 1**).

Table 1: Body weight and blood glucose concentration two hours after intra-peritoneal bolus in malnourished rats at P25, P55 and at P90 after nutritional rehabilitation.

Age (days)	Groups	Body weight (g)	Blood glucose (mg/ dL)
25	C	48.40 ± 1.73	66.25 ± 5.13
	MGL	20.35 ± 0.86 *	159.00 ± 14.20 *
55	C	230.75 ± 4.69	106.25 ± 3.94
	MPW	65.50 ± 2.25 *	205.25 ± 17.75 *
90	C	363.75 ± 5.18	126.00 ± 27.39
	MGL-R	245.25 ± 14.55 *	103.75 ± 7.63
	MPW-R	255.00 ± 16.58 *	139.25 ± 16.36

* $p \leq 0.01$; ($n = 4$); controls different to malnourished or rehabilitated groups.

3.2 Number of Fos immunoreactive neurons in hypothalamic nuclei.

The effect of the glucose bolus on the number of Fos-IR cells in representative sections of hypothalamic nuclei at the level of ARC, PVN and VMH in C and MPW rats at P55, and in C and rehabilitated groups at P90, where the most significant differences were observed, is shown in **Figure 1** and **Figure 2** respectively. Glucose injection resulted in significant increased number of Fos-IR cells in the VMH of MGL rats as compared to the C group ($p = 0.04$; **Figure 3C**), for this group other hypothalamic nuclei exhibited a similar response as the controls (**Figures 3A, 3B** and **Figure 4A, 4B**). In MPW rats a significant increased number of Fos-IR neurons was observed in the ARC ($p = 0.003$) and VMH ($p = 0.002$) (**Figure 1A, 1B, 1E, 1F** and **Figure 3A, and 3C**; respectively) and a significant decrease was observed in the PVN ($p = 0.05$; **Figure 1C, 1D** and **Figure 3B**) as compared to the controls. At P90 after nutritional rehabilitation the one way ANOVA indicated statistical difference among groups for ARC ($F_{(2,9)} = 9.89$; $p = 0.005$), PVN ($F_{(2,9)} = 7.55$; $p = 0.008$) and VMH ($F_{(2,9)} = 4.78$; $p = 0.03$). The *post hoc* test indicated in the MPW-R rats a significant reduced number of Fos-IR neurons in the ARC (**Figure 2A, 2C** and **Figure 3A**), in the PVN (**Figure 2D, 2F** and **Figure 3B**) and in the VMH (**Figure 2G, 2I** and **Figure 3C**) while MGL-R did showed differences (**Figures 2A, 2B, 3A; 2D, 2E, 3B** and **2G, 2H, 3C**). No significant effects of Fos-IR cells were observed in the DMH and PeF due to malnutrition or rehabilitation (**Figure 4A** and **4B**).

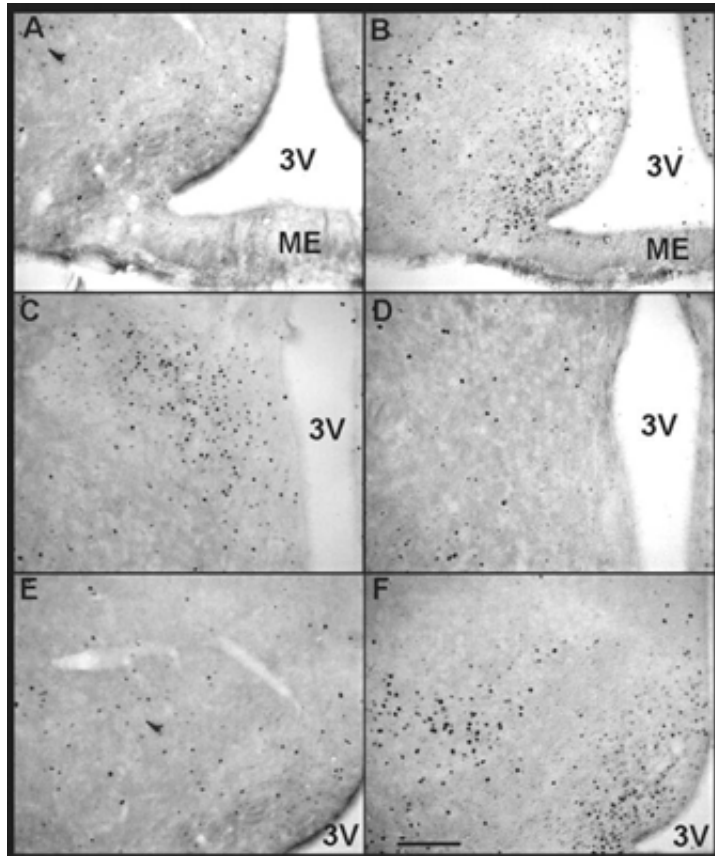


Figure 1. Representative photomicrographs of Fos immunoreactive cells in coronal sections of the arcuate (A and B), paraventricular (C and D) and ventromedial (E and F) hypothalamic nuclei in the control (left panels) and in the post-weaning malnourished (MPW) group (right panels) at 55 days of age, 2 hours after intra-peritoneal glucose injection. Scale bar-100 μ m. Third ventricle, 3V; medial eminence, ME.

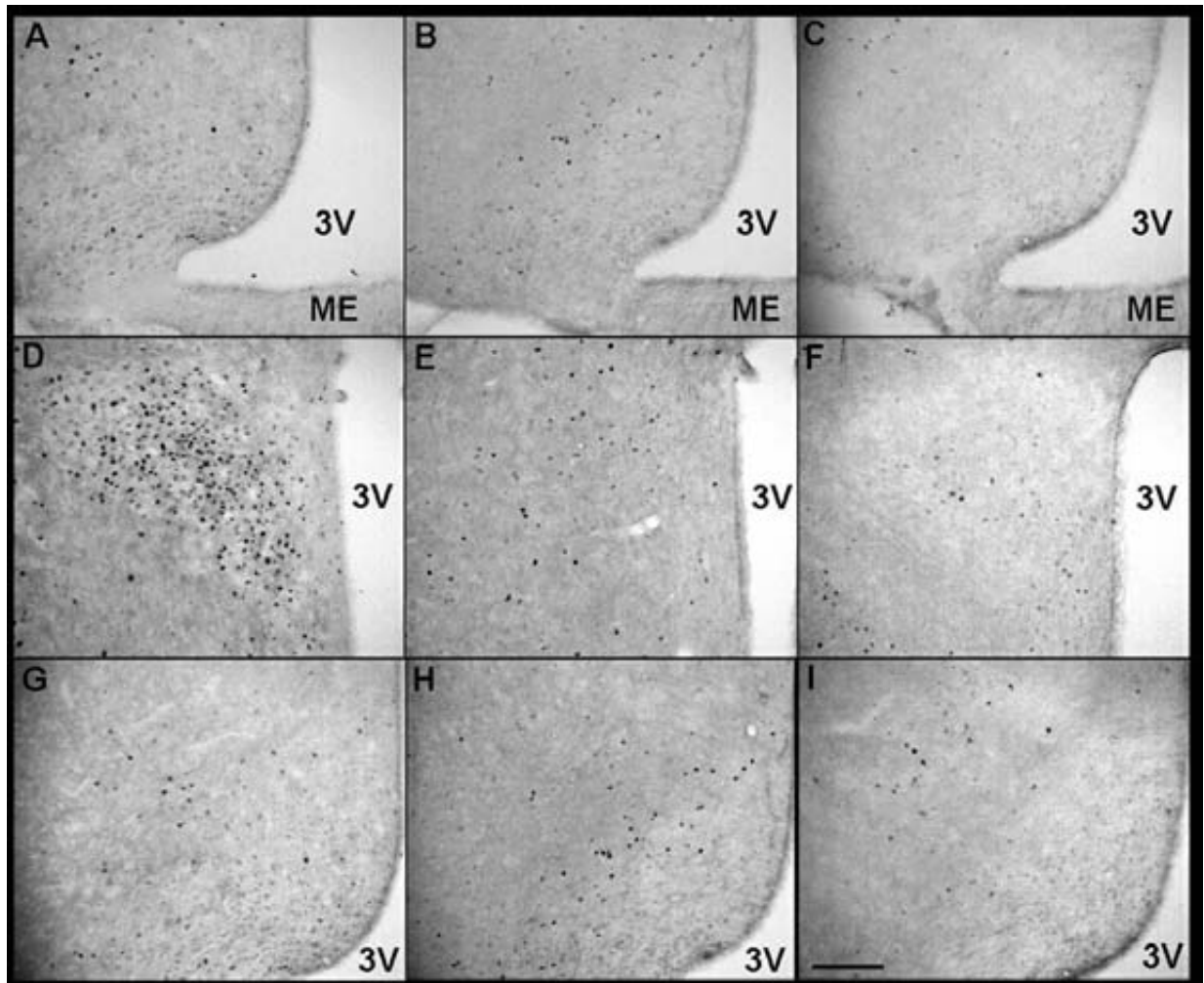


Figure 2. Photomicrographs illustrating Fos immunoreactive neurons in representative hypothalamic coronal sections of control (left panels), malnourished rats during gestation and lactation (middle panels) and rats malnourished after weaning (right panels) at 90 days of age, after an interval of nutritional rehabilitation and 2 hours after intra-peritoneal glucose injection. A, B, and C correspond to the arcuate nucleus; D, E and F to the paraventricular nucleus and G, H and I, to the ventromedial nucleus. Scale bar corresponds to 100 μ m. Third ventricle, 3V; medial eminence, ME.

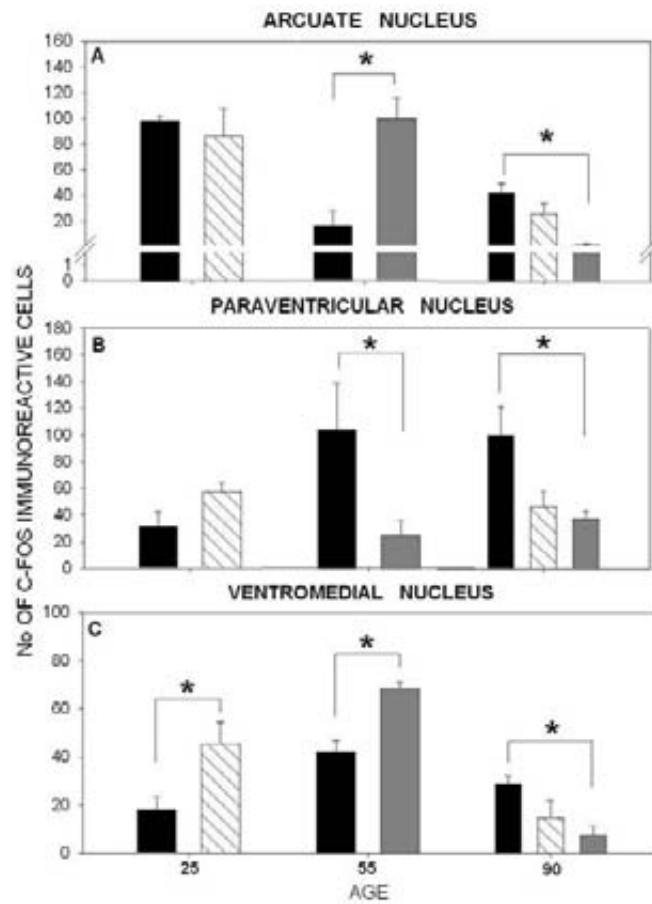


Figure 3. Mean number (\pm sem) of Fos-IR neurons in the ARC, PVN and VMH nuclei 2 hours after intraperitoneal glucose injection in male rats malnourished from gestation to lactation (MGL; white bars), malnourished after weaning to P55 (MPW; gray bars), and after balanced diet rehabilitation at P90 (MGL-R; striped-white bars and MPW-R striped-gray bars) and their well nourished controls (black bars). Asterisks indicate statistical difference between C and malnourished or rehabilitated groups ($p \leq 0.01$; $n = 4$ per group).

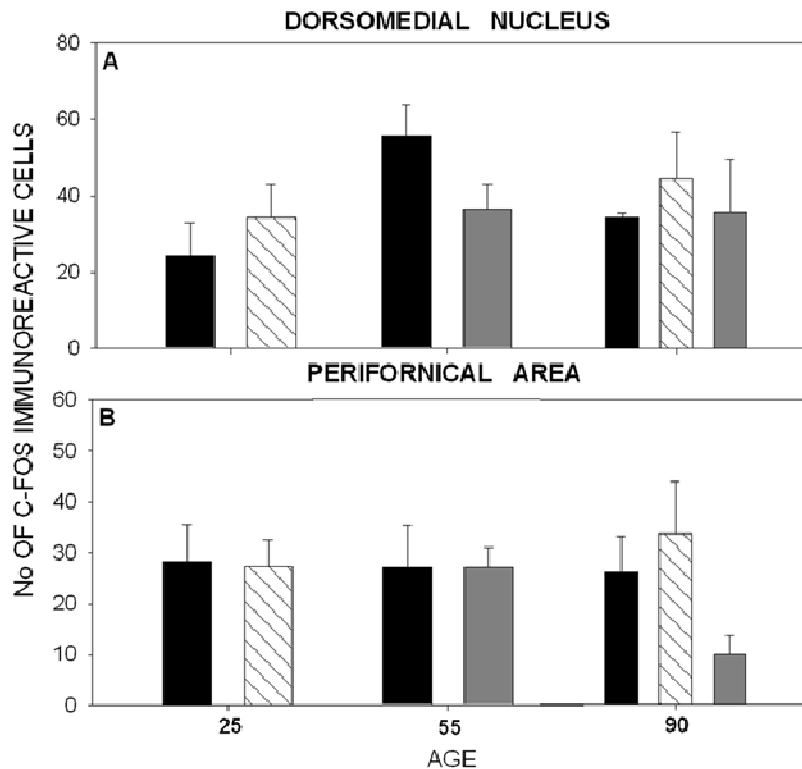


Figure 4. Mean number (\pm sem) ($n = 4$ per group) of Fos-IR neurons in the dorsomedial nucleus and Perifornical area 2h after intra-peritoneal glucose injection. No significant differences were observed in male rats malnourished from gestation to lactation (MGL; white bars), malnourished after weaning to P55 (MPW; gray bars), and after balanced diet rehabilitation at P90 (MGL-R; striped-white bars and MPW-R striped-gray bars) as compared with their well nourished controls (black bars).

4. DISCUSSION

Malnutrition during gestation and lactation, as well as from weaning to P55, induced a slow growth rate leading to underweight in rats. Rehabilitation with a regular chow diet allows a catch up in body weight but was not enough to achieve similar values as the controls at P90. Growth delay and underweight are consistent effects of gestation-lactation malnutrition as described previously by our group and others^{21,24,26}; interestingly, malnutrition from weaning to P55 also exerted a severe effect on body weight, leading rats to slow down their growth rate and to weigh only 28% of their controls after 30 days of low-protein diet. This later group reflects the impact of malnutrition during the later stages of development that comprise the period of sexual maturation in rats, which is not seen by many groups as a critical period for development^{7,21,22} therefore it is relevant to point out that the effects were similar in severity as those observed during gestation and lactation. The failure to catch up after nutritional rehabilitation clearly confirms the vulnerability of the body to dietary restriction during both developmental intervals of fast growth.

Two hours after glucose administration both malnourished groups exhibited significantly higher blood glucose values as compared to their well nourished controls suggesting a process of glucose intolerance, insulin resistance or a deficient pancreatic

response for insulin production, as previously reported by our group and others^{9,33}. In a previous study we reported similar effects after a glucose tolerance test and we reported low insulin values in both MGL and MPW rats⁹, suggesting the possibility of a deficient pancreatic response and possible pancreatic damage. Low insulin production has been ascribed to a permanent reduction in pancreatic vascularization, reduced pancreatic islet size³⁴ and decreased number of pancreatic β -cells due to early nutritional insult³⁵. It is important to point out that post-weaning malnutrition produced similar severe effects as early malnutrition on peripheral glucose values. Aguayo-Mazzucato *et al*³⁶ described that the interval for pancreatic development extends up to post-natal day 28, indicating that the critical period of development for the pancreas lasts to the early post-weaning period. They demonstrate that blood glucose homeostasis and the secretion of insulin and glucagon are associated with morphological and functional changes of alpha and beta cell populations during this post-weaning period. Our present data suggest that malnutrition after weaning affects this last period of pancreatic functional adjustment. However, nutritional rehabilitation, as observed in MGL-R and MPW-R resulted in similar glucose values as the controls, suggesting the possibility of metabolic adjustments in later stages of life. Such reversion of effects was previously reported by Hales *et al*⁷ for early malnourished rats, suggesting increased insulin sensitivity after nutritional rehabilitation.

In early malnourished rats glucose injection induced an increased number of Fos-IR neurons in the VMH, while in late malnourished rats it resulted in increased number of Fos-IR cells in the ARC and in the VMH, and diminished number of Fos positive cells in the PVN. In spite of nutritional rehabilitation MPW-R maintained a long lasting disturbed hypothalamic response after the glucose bolus. Plasma glucose is sensed in the viscerosensory circuits integrated by the vagal complex, including the nucleus of the solitary tract and the area postrema in the brainstem and in other circumventricular organs located in the hypothalamus and forebrain³⁷. Electrophysiological recordings and detection of Fos immunoreactivity have shown afferent and efferent pathways interconnecting glucose sensing structures in order to integrate information concerning immediate metabolic status¹². Thus the Fos response observed in hypothalamic nuclei after glucose injection may be the result of direct activation to glucose sensing neurons in the hypothalamus, and the result of integrative activity due to the interaction of this complex neural circuitry.

In the ARC nucleus, a high number of Fos-IR cells is induced by a fasting state, while glucose infusion or re-feeding inhibits the number of Fos positive neurons³⁸. In contrast, the PVN shows the inversed pattern with increased number of Fos-IR cells after intracarotid glucose administration^{19,20} and low number of Fos-IR neurons under euglycemic or hypoglycemic conditions³⁹. This expected response in the ARC and in the PVN was observed at P90 in the control group, but not in MPW-R rats indicating that in the hypothalamus dietary rehabilitation did not reverse deleterious functional strategies elicited by malnutrition. At P25 neither the controls nor malnourished rats exhibited the expected pattern after the glucose bolus in the ARC and in the PVN, suggesting immaturity of this neuronal system. At P55 control rats exhibited the expected Fos response as observed in adult controls, while malnourished rats (MPW) still exhibited high number of Fos-IR neurons in the ARC and low Fos-IR neurons in the PVN after the glucose bolus, indicating immaturity or a deleterious effect due to post-weaning malnutrition. This last finding points out the post-weaning stage as a vulnerable period for hypothalamic functional adjustments. Present data fit with the observations of Plagemann *et al*²⁵ who reported deleterious effects due to early malnutrition on the development of hypothalamic nuclei and on cell density in the PVN.

They also reported diminished number of NPY positive cells in the ARC which are sensitive to a glucose concentration.

Alternatively, the high number of Fos-IR neurons in the ARC both in controls and in MGL rats at P25, after glucose bolus may be related to the immature stage of the blood brain barrier (BBB), since at the level of the ARC it is still not fully developed at weaning⁴⁰. Due to this immature state high peripheral circulating glucose may influence the ARC response. In addition increased or extremely decreased glucose levels modify the permeability of the BBB⁴¹ resulting in high levels of glucose reaching the ARC nucleus and thus inducing altered cellular activation in both groups. Consequently the altered response of the ARC in MPW animals and after rehabilitation (MPW-R) may indicate a long lasting change of the BBB. In addition since it is well known that cell populations in the ARC project to the PVN and modulate its response to glucose⁴² the modified activity of the ARC in the MPW rats could have influenced the response in the PVN.

During development a series of metabolic and neuronal factors can influence the growth, and functional organization in the hypothalamus. Vickers *et al*⁴³ and Delahaye *et al*⁴⁴, suggest that during development this functional and anatomical organization in the ARC nucleus is dependent on an early leptin surge by adipose tissue. The absence of this leptin surge at this critical period leads to decreased expression of POMC mRNA in the ARC. In early malnourished rats leptin is significantly diminished⁴⁴, and this maybe a relevant factor for altered response after the IPB. Nitric oxide (NO) plays an important role in the regulation of food intake and energy balance⁴⁵ and nitric oxide synthase (NOS) is a mediator of the effects of leptin and NPY on food intake behavior and energy metabolism in the ARC-PVN-VMH circuitry⁴⁶. Marcelino *et al*⁴⁷ demonstrated that NOS is diminished in the malnourished animals and may then affect the influence of leptin on the hypothalamic circuitry development. Also glucocorticoids and the corticotropin-releasing hormone (CRH) can influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA)⁴⁸. Especially CRH, a strong anorexigenic neuropeptide which is produced in the PVN is vulnerable to nutritional insults⁴⁹. Nishiyama *et al*⁴⁹, described that during starvation CRH is inhibited, while Nuñez *et al*⁵⁰ reported that undernutrition induces an over expression of CRH in the PVN. Thus we conclude that malnutrition can affect the development of the hypothalamus through different pathways. Further developmental studies are necessary to integrate the influence of central and peripheral signals in the development of hypothalamic nuclei and functional adaptations to malnutrition.

In the VMH 3-22 % of its cells are glucosensitive and 14-49 % are glucoresponsive neurons⁵¹ conferring to the VMH a pivotal role for sensing the metabolic state⁵². The increased number of Fos-IR neurons in the VMH of the MGL and MPW rats may be due to high blood glucose levels that remained after the glucose bolus in this groups, different from the well nourished controls and adult groups at P90. This explanation finds support in previous studies describing increased number of Fos positive cells in the VMH associated with glucose administration^{12,19}. Moreover electrophysiological studies have demonstrated that VMH neurons respond in a dose dependent way to glucose infusions⁵². This is further supported by the fact that after nutritional rehabilitation when blood glucose levels in both groups were normalized the response of the VMH was similar to the controls in MGL- rats. In addition, the decreased number of Fos-IR cells observed in the MPW-R rats suggests an altered sensitivity of the VMH to a normal glucose in spite of nutritional rehabilitation.

In summary, our study demonstrates that malnutrition early in life and especially from weaning to 55 days modifies hypothalamic activity after a glucose bolus. The ARC, PVN and VMH were especially affected while the DMH and PeF area did not show any effects due to early malnutrition. This modified response observed after malnutrition, may reflect different strategies for glucose sensing and for maintaining energy balance, as a possible adaptation to a scarce nutritional state during development. The permanent disturbance in hypothalamic response to peripheral nutrients, as observed in the rehabilitated group (MPW-R), may lead to a failure to respond to metabolic challenges in a later stage of life, when nutritional conditions have improved. This permanent effect on the hypothalamus may be one of the factors promoting obesity and metabolic syndrome.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to Biol. Teresa Solis-Salazar for technical assistance. This project was supported by grants CONACYT 43950-M; PAPIIT-UNAM IN-203803 and IN-203907. We thank to anonymous reviewers for their revision and comments that have significantly improved the manuscript. MCMS received PhD fellowship by CONACyT and DGEP, posgrado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

6. REFERENCES

- 1.-González-Barranco J, Ríos-Torres JM, Castillo-Martínez L, *et al.* Effect of malnutrition during the first year of life on adult plasma insulin and glucose tolerance. *Metabolism*. 2003; 52: 1005-1011.
- 2.-Fortman JK 2nd, Reichling T, German RZ. The impact of maternal protein malnutrition on pre-weaning skeletal and visceral organ growth in neonatal offspring of *Rattus norvegicus*. *Growth Dev Aging*. 2005; 69: 39-52.
- 3.-Burns SP, Desai M, Cohen RD, *et al.* Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J Clin Invest*. 1997; 100: 1768-1774.
- 4.-Agote M, Goya L, Ramos S, *et al.* Glucose uptake and glucose transporter proteins in skeletal muscle from undernourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 281: E1101-1109.
- 5.-Remacle C, Dumortier O, Bol V, *et al.* Intrauterine programming of the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab*. 2007; 9: 196-209.
- 6.-Shepherd PR, Crowther NJ, Desai M, *et al.* Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *Br J Nutr*. 1997; 78: 121-129.
- 7.-Hales CN, Desai M, Ozanne SE, *et al.* Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem Soc Trans*. 1996; 24: 341-350.
- 8.-de Rooij SR, Painter RC, Holleman F, *et al.* The metabolic syndrome in adults prenatally exposed to the Dutch famine. *Am J Clin Nutr*. 2007; 86: 1219-1224.
- 9.-Miñana-Solis MC, Escobar C. Post-weaning protein malnutrition in the rat produces short and long term metabolic impairment, in contrast to earlier and later periods. *Int J Biol Sci*. 2008; 4: 422-432.
- 10.-Sandoval D, Cota D, Seele J. The integrative role of CNS fuel-sensing mechanisms in energy balance and glucose regulation. *Annu Rev Physiol*. 2008; 70: 513-535.
- 11.-Routh VH. Glucose-sensing neurons: are they physiologically relevant? *Physiol Behav*. 2002; 76: 403-413.
- 12.-Marty N, Dallaporta M, Thorens B. Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology*. 2007; 22: 241-251.
- 13.-Demuro G, Obici S. Central nervous system and control of endogenous glucose production. *Curr Diab Rep*. 2006; 6: 188-193.

- 14.-Kreier F, Kap YS, Mettenleiter TC, *et al.* Tracing from fat tissue, liver and pancreas: A neuroanatomical framework for the role of the brain in type 2 diabetes. *Endocrinology*. 2006; 147:1140-1147.
- 15.-Obici S, Zhang BB, Karkanias G, *et al.* Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med*. 2002; 8: 1376-1382.
- 16.-Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol*. 2000; 62: 413-437.
- 17.-Horvath TL, Diano S, Tschöp M. Brain circuits regulating energy homeostasis. *Neuroscientist*. 2004; 10: 235-246.
- 18.-Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, *et al.* Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*. 1987; 237: 192-197.
- 19.-Dunn-Meynell AA, Govek E, Levin BE. Intracarotid glucose selectively increases Fos-like immunoreactivity in paraventricular, ventromedial and dorsomedial nuclei neurons. *Brain Res*. 1997; 748: 100-106.
- 20.-Guillod-Maximin E, Lorsignol A, Alquier T, *et al.* Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats. *Neuroendocrinol*. 2004; 16: 464-471.
- 21.-Resnick O, Morgane PJ, Hasson R, *et al.* Overt and hidden forms of chronic malnutrition in the rat and their relevance to man. *Neurosci Biobehav Rev*. 1982; 6: 55-75.
- 22.-Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, *et al.* Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience Biobehav Rev*. 1993; 17: 91-128.
- 23.-Aguilar-Roblero R, Salazar-Juarez A, Rojas-Castaneda J, *et al.* Organization of circadian rhythmicity and suprachiasmatic nuclei in malnourished rats. *Am J Physiol*. 1997; 273: R1321-R1331.
- 24.-Cintra L, Galván A, Díaz-Cintra S, *et al.* Protein malnutrition on suprachiasmatic nucleus cells in rats of three ages. *Bol Estud Med Biol*. 1994; 42: 11-19.
- 25.-Plagemann A, Harder T, Rake A, *et al.* Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutr*. 2000; 130: 2582-2589.
- 26.-Miñana-Solis MC, Escobar C. Increased susceptibility to metabolic alterations in young adult females exposed to early malnutrition. *Int J Biol Sci*. 2006; 3: 12-19.
- 27.-Durán P, Miranda-Anaya M, Mondragón-García I, *et al.* Protein malnutrition and aging affects entraining and intensity of locomotor activity and body temperature circadian rhythms in rats. *Nutr Neurosci*. 2008; 11: 263-268.
- 28.-Suga A, Hirano T, Kageyama H, *et al.* Effects of fructose and glucose on plasma leptin, insulin, and insulin resistance in lean and VMH-lesioned obese rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 278: E677-E683.
- 29.-Fekete C, Singru PS, Sanchez E, *et al.* Differential Effects of Central Leptin, Insulin, or Glucose Administration during Fasting on the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis and Feeding-Related Neurons in the Arcuate Nucleus. *Endocrinology*. 2006; 147: 520-529.
- 30.-Grome JJ, McCulloch J. The effects of apomorphine upon local cerebral glucose utilization in conscious rats and in rats anesthetized with chloral hydrate. *J Neurochem*. 1983; 41: 569-576.
- 31.-Uematsu M, Takasawa M, Hosoi R *et al.* Uncoupling of flow and metabolism by chloral hydrate: a rat in-vivo autoradiographic study. *Neuroreport*. 2009; 18: 219-222.
- 32.-Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press. 1998.
- 33.-Latorraca MQ, Reis MA, Carneiro EM, *et al.* Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. *J Nutr*. 1998; 128: 1643-1649.
- 34.-Snoeck A, Remacle C, Reusens B, *et al.* Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate*. 1990; 57: 107-118.
- 35.-Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, *et al.* Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes*. 1991; 40: 115-120.
- 36.-Aguayo-Mazzucato C, Sanchez-Soto C, Godinez-Puig V, *et al.* Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS ONE*. 2006; 20: e35.
- 37.-Koehnle TJ, Rinaman L. Progressive postnatal increases in Fos immunoreactivity in the forebrain and brain stem of rats after viscerosensory stimulation with lithium chloride. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; 292: R1212-R1223.
- 38.-Becskei C, Lutz TA, Riediger T. Glucose reverses fasting-induced activation in the arcuate nucleus of mice. *Neuroreport*. 2008; 19: 105-109.
- 39.-Ao Y, Wu S, Go VL, *et al.* Maintaining euglycemia prevents insulin-induced Fos expression in brain autonomic regulatory circuits. *Pancreas*. 2005; 31: 142-147.
- 40.-Vanucci SJ, Seaman LB, Brucklacher RM, *et al.* Glucose transport in developing rat brain: glucose transporter proteins, rate constants and cerebral glucose utilization. *Mol Cell Biochem*. 1994; 140: 177-184.

- 41.-Simpson IA, Appe, NM, Hokari M, *et al.* Blood-brain barrier glucose transporter: effects of hypo- and hyperglycemia revisited. *J Neurochem.* 1999; 72: 238-247.
- 42.-Williams G, Bing C, Cai XJ, *et al.* The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav.* 2001; 74: 683-701.
- 43.-Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, *et al.* Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology.* 2005; 146: 4211-4216.
- 44.-Delahaye F, Breton C, Risold PY, *et al.* Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rats pups. *Endocrinology.* 2008; 149: 470-475.
- 45.-Morley JE, Flood JF. Effect of competitive antagonism of NO synthetase on weight and food intake in obese and diabetic mice. *Am J Physiol.* 1994; 266: R164-R168.
- 46.-Morley JE, Alshaher MM, Farr SA, *et al.* Leptin and neuropeptide Y (NPY) modulate nitric oxide synthase: further evidence for a role of nitric oxide in feeding. *Peptides.* 1999; 20: 595-600.
- 47.-Marcelino AA, Moura AS, Barradas PC, *et al.* Hypothalamic nuclei nitric oxide synthase expression in rats malnourished during early lactation period. *Nutr Neurosci.* 2004; 7: 177-184.
- 48.-Kehoe P, Mallinson K, Bronzino J, *et al.* Effects of prenatal protein malnutrition and neonatal stress on CNS responsiveness. *Brain Res Dev Brain Res.* 2001; 132: 23-31.
- 49.-Nishiyama M, Makino S, Iwasaki Y, *et al.* CRH mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus is inhibited despite the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during starvation. *Brain Res.* 2008; 1228: 107-112.
- 50.-Núñez H, Ruiz S, Soto-Moyano R, *et al.* Fetal undernutrition induces overexpression of CRH mRNA and CRH protein in hypothalamus and increases CRH and corticosterone in plasma during postnatal life in the rat. *Neurosci Lett.* 2008; 448: 115-119.
- 51.-Silver IA, Erecińska M. Glucose-induced intracellular ion changes in sugar-sensitive hypothalamic neurons. *J Neurophysiol.* 1998; 79: 1733-1745.
- 52.-Song Z, Levin BE, McArdle JJ, *et al.* Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes.* 2001; 50: 2673-2681.

7. EXPERIMENTO 3:

“LA MALNUTRICIÓN TEMPRANA Y AL DESTETE ALTERA LA EXPRESIÓN DE α -MSH EN EL HIPOTÁLAMO: POSIBLE RELACIÓN CON LA OBESIDAD A LARGO PLAZO”.

7.1. Hipótesis Específicas

En ratas malnutridas se modificará la expresión de péptidos orexigénicos y anorexigénicos en núcleos hipotalámicos involucrados con el balance energético y la ingesta de alimento.

Después de la rehabilitación nutricional balanceada a corto plazo las ratas previamente malnutridas mostrarán la expresión de péptidos orexigénicos y anorexigénicos similar a los controles nutricionales.

7.2. Objetivos Específicos

Observar en ratas malnutridas la expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos en núcleos hipotalámicos involucrados con el balance energético y la ingesta de alimento.

Evaluar los efectos de la rehabilitación nutricional balanceada a corto plazo sobre la expresión de neuropéptidos en núcleos hipotalámicos.

“Early and post-weaning malnutrition impairs α -MSH expresión in the hypothalamus: A posible link to long long-term overweight”.

María del Carmen Miñana-Solis, and Carolina Escobar.

Nutrition Neuroscience (enviado) 2009.

ABSTRACT

The present study explored the effects of early and post-weaning malnutrition and nutritional rehabilitation on orexigenic (ORX and NPY) and anorexigenic peptides (α -MSH) expressed in hypothalamic nuclei. Male Wistar rats were malnourished during gestation-lactation (MGL) or from weaning to post-natal day 55 (MPW; P55). Two groups of rats were rehabilitated with a balanced diet until P90 (MGL-R and MPW-R, respectively). After a glucose tolerance test (GTT) brains were processed for immunohistochemistry. Malnourished groups were hyperglycemic after GTT. ORX expression did not display any difference. Only MGL rats showed increased NPY immunoreactivity in ARC and PVN nuclei, and both malnourished groups showed low α -MSH expression in the PVN and DMH, as compared with their controls. After nutritional rehabilitation rats showed normal GTT, increased rate of body and adipose tissue weights and high proportion of food ingestion. Both rehabilitated groups' maintained low α -MSH expression in the PVN indicating a deleterious long-lasting effect.

Key words: malnutrition, energy balance, hypothalamus, metabolic programming, appetite programming

1. INTRODUCTION

Epidemiological studies have linked poor early nutrition and susceptibility as a way to increase cardiovascular disease, obesity, type 2 diabetes *mellitus* and other metabolic diseases in adulthood^{1, 2, 3}. Animal models have been developed in order to explain the physiological basis of this relationship and to dissect the contribution of genetic and environmental factors. Models for investigating the role of fetal and post-natal malnutrition on diseases in adulthood and their underlying mechanism are based mainly on maternal protein restriction⁴. The consequences of a restricted diet for offspring bear striking similarities to human metabolic disorders in adult life⁵. Recently our group demonstrated that not only gestation-lactation malnutrition, but also low protein diet from weaning to 55 days post-natal, exerts deleterious long-lasting effects on growth and glucose metabolism⁶.

Our group and others have evidenced that peripheral metabolic disarrangement due to malnutrition correlate with neural alterations in hypothalamic nuclei involved in energy homeostasis^{7, 8, 9}. These studies have reported that peripheral and hypothalamic signals providing metabolic balance information are altered in malnourished animals.

The hypothalamus is the brain area in which metabolic energy expenditure and food intake signals are integrated and regulated. Hypothalamic neurons are target of endocrine and metabolic peripheral signals (i.e., leptin, insulin and glucose among others) and express different neuropeptides in order to modulate the feedback pathways

for energy balance, regulation of the endocrine axis, body weight and feeding behaviour^{10, 11}. In hypothalamic nuclei two groups of neuropeptides with opposite effects on feeding behavior and energy homeostasis have been identified, and according to their effects they are classified as orexigenic or anorexigenic peptides¹².

Among the orexigenic peptides that promote food intake, body weight gain and decreased energy expenditure, neuropeptide Y (NPY) and orexins (ORX), also known as hypocretins, are important signals regulating these processes. NPY is abundantly synthesized by neurons of the ventromedial arcuate (ARC) nucleus which projects towards the paraventricular (PVN), dorsomedial (DMH), ventromedial hypothalamic nucleus (VMH) and lateral hypothalamic area (LH)¹³. Orexin producing neurons are almost exclusively localized in the LH and widely project to the ARC and VMH in the hypothalamus and to forebrain areas and brain stem nuclei involved in feeding behavior¹⁴.

The main functional anorexigenic peptide implicated in energy balance is α -MSH (alpha-melanocyte stimulating hormone); a peptide from the POMC complex, α -MSH is known to reduce food intake and body weight and increases energy expenditure¹¹. This peptide is expressed in neurons of the lateral ARC, which sends their projections to the LH, PVN and DMH nucleus¹⁵.

For the hypothalamus, glucose sensing is a pivotal role for the control of energy homeostasis. Hyper- or hypoglycemia is detected by specialized neurons, including orexigenic and anorexigenic neurons which then initiate the counter regulatory response keeping blood glucose levels in the normal range¹⁶. Low glucose levels induce an increase in NPY expression in the ARC nucleus while glucose injection reduces its expression¹⁷. The α -MSH neurons in the ARC nucleus are excited by increased glucose and inhibited by low glucose concentration¹⁸. On the other hand, hypoglycemia stimulates the expression of ORX in the LH area whereas signals related to nutrient ingestion decrease its production¹⁹.

Terroni *et al* 2005²⁰ described in fetal mice from pregnant dams fed with a low protein diet that mRNA of POMC and NPY in the ARC nucleus are both increased, indicating that changes in the nutritional status of a pregnant mother can alter the balance among the offspring's neuropeptides system. Furthermore, early malnutrition (gestation-lactation) modifies the expression of hypothalamic neuropeptides inducing increased expression of NPY in the PVN and LH area in weanling offsprings²¹. Based on such evidence it is suggested that dysfunction of the hypothalamic system may underlie the etiology of metabolic diseases such as obesity and diabetes type 2 in adult life^{12, 22}. This is further supported by studies associating loss of the ability for glucose sensing in α -MSH and NPY neurons in the ARC nucleus and propensity to develop obesity due to a high fat diet^{23, 24, 25}. Obesity has been associated with decreased α -MSH and increased NPY production in the ARC nucleus²⁶; also diabetes is related to increased NPY expression in the ARC and PVN²⁷ and reduced α -MSH mRNA expression in the ARC²⁸. In the LH area ORX are generally diminished in hyperphagic rodents²⁹ as well as in diabetic animals³⁰.

In a previous study, we reported that gestation-lactation (MGL) and post-weaning (MPW) malnutrition induce an altered c-Fos response in hypothalamic nuclei involved in energy homeostasis after a glucose bolus⁷, suggesting deleterious effects of the low protein diet on the systems that control energy balance. Interestingly the deleterious effects of the post-weaning malnutrition were not reverted by nutritional rehabilitation and thus the response to a glucose bolus remained altered at the age of 90 days.

From this previous study we hypothesized that malnutrition early in life and after weaning may modify the expression of peptides associated with energy balance. To test

our hypothesis we evaluated the expression of α -MSH and NPY in the ARC, PVN and DMH and the expression of ORX in the lateral hypothalamus (LH). We evaluated immunohistochemical expression of the neuropeptides after an acute interval of malnutrition, at 25 post-natal days for the MGL and at 55 post-natal days for the MPW rats, two hours after an intraperitoneal glucose bolus. This same response was tested in rats rehabilitated with a balanced diet until 90 days of life, in order to determine possible reversion of deleterious effects after nutritional rehabilitation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Subjects and general conditions

Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used for this study and were bred at the Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.

Adult and post-weaning rats were housed individually in acrylic cages in a room maintained with a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 6:00h), constant temperature (22 ± 1 °C) and 40-50% humidity, with free access to food and water. All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering. The experimental procedures were carried out in compliance with the principles of Biosecurity and Bioethics Committee in the Faculty of Medicine, UNAM, following the guidelines of the Mexican Laws for Animal Care (Decreto de la ley de protección a los animales, Gaceta Oficial del Distrito Federal 26/02/02), which comply with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication 80-23, revised 1996).

2.2 Nutritional conditions

Male rats born to 3 month-old primiparous females exposed either to a balanced regular laboratory diet (Purina chow 5001) or an isocaloric low protein diet (6% casein; Teklad, Harlan TD 920906) were used at 3 different ages. The 6% casein and the balanced diet have been previously employed by our group and others for similar studies^{7, 31, 32}.

Control and malnourished groups were obtained as described elsewhere⁶. Briefly, control (C) rats were born to dams nourished with a balanced diet during gestation and lactation and were maintained in the same nutritional condition until post-natal (P) day 90. Early malnourished rats (MGL) were born from dams malnourished two weeks previous to mating, during gestation and lactation until weaning (P25). Post-weaning malnourished rats (MPW) were born to dams exposed to a balanced diet during gestation and lactation, at weaning the offspring were nourished with low protein diet for 30 days, thus until P55.

At the end of the malnutrition periods (P25 and P55, respectively in each group) one-half of the male rats were used for study the acute effects of malnutrition whereas other rats were transferred to a balanced diet until P90 for evaluating the effects of nutritional rehabilitation (R), resulting four groups: MGL, MPW, MGL-R and MPW-R respectively and their corresponding controls. Rats were euthanized at P25, P55 and P90.

2.3 Body weight and food consumption

Body weight was evaluated in MGL rats at P2 and P25. The MPW rats were also weighed at P25 and P55. Both rehabilitated groups of rats were weighed weakly during rehabilitation periods until P90. We calculated the increase in the body weight ratio subtracting the initial and final values during malnourished or rehabilitated period. Control groups were evaluated at the same ages as malnourished and rehabilitated groups.

Food ingestion was evaluated weakly and the average obtained during rehabilitation periods for MGL-R and MPW-R rats and their balanced diet controls. Food was provided *ad libitum* in each rat cage and was weighed both at the beginning and at the end of a 24-hour period (at 8:00 am). To obtain the total amount of ingested food we subtracted the consumption from P25 to P90 and from P55 to P90 for MGL-R and MPW-R groups, respectively. We also obtained the proportion of ingested food adjusted for body weight in each group.

2.4 Intraperitoneal bolus (IPB) of glucose and perfusion

At the age of P25 for MGL, P55 for MPW and P90 for rehabilitated groups, brains were obtained after an intraperitoneal glucose bolus as described before⁷. Briefly, after 16 h of food deprivation (food was removed at 18:00 h), conscious rats were weighed and then received an IPB of glucose as performed for a glucose tolerance test. Glucose solution was administered in a dose of 1g/ kg of body weight (1g/ 10 ml glucose solution in NaCl 0.9%).

Two hours after the glucose injection, rats at the indicated ages in each group (n = 3 per group and age) were deeply anaesthetized with an overdose of pentobarbital (Sedalpharma; Pet's Pharma de México), allowed to insure a similar metabolic condition for all rats. Before starting perfusion and under anesthesia a drop of blood from the heart auricle was obtained for determining blood glucose with a glucometer (Ascencia ELITE of Bayer). Rats were transcidentally perfused with 200 ml of NaCl (0.9%) followed by 200 ml of paraformaldehyde (4%) in phosphate buffer saline (PBS 0.1M, pH 7.2). After perfusion abdominal, retroperitoneal and epididymal white adipose tissues were dissected and weighed. The weight proportion for each fat pad with respect to body weight was calculated. Brains were removed, post-fixed for 1 day in paraformaldehyde, and cryoprotected in 10, 20 and 30% sucrose in PBS. Brains were frozen and 40µm serial coronal sections were obtained with a cryostat at the level of the hypothalamus (Bregma -1.40 to -3.30 mm, ± 0.15 mm; ³³) and collected in 0.1 M PBS for immunohistochemical analysis. Sections were serially collected in four sets of which 3 sets were used for this study.

2.5 Immunohistochemistry

Brain serial slices were processed for immunostaining for Orexin A (ORX), neuropeptide Y (NPY) and α -MSH. Free floating sections were incubated during 48 h at 4° C in primary antibody for ORX A made in goat (1:1000; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA), NPY made in rabbit (1:1000; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA) or α -MSH made in sheep (1:10000; Chemicon International Inc). The primary antibody was diluted in PBS, 1% goat or rabbit serum and 0.3% Triton X-100 (PBSRT or PBSGT respectively). Tissues were rinsed three times for 10 min in PBS, then were incubated for 2 h at room temperature in biotinylated secondary antibody IgG (anti-goat made in rabbit, anti-rabbit made in goat, anti-sheep made in rabbit, Vector Laboratories) 1:200 in PBSRT/GT. After two hours tissues were rinsed three times and then were incubated for 2 h in avidin-biotin-peroxidase complex (0.9% avidin and 0.9% biotin solutions; Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratories) diluted in PBSRT/GT. Tissues were rinsed again three times with PBS and peroxidase activity was revealed with 3, 3' diaminobenzidine (DAB; Sigma. 0.05 mg/ ml, in Trisma buffer PBS) and 35µl/ 50 ml, 30% hydrogen peroxide. The reaction was stopped by rinsing sections in PBS. Sections were mounted on gelatin-coated slides, and dehydrated through a series of alcohols, cleared with xylene and coverslipped with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

2.6 Quantification of ORX, NPY and α -MSH cells and fibers

ORX positive cell bodies were mainly found in the perifornical area and posterior LH, and cellular bodies expressing α -MSH were observed and evaluated in the lateral ARC nucleus. We counted all the positive cells for both neuropeptides in the nuclei. Not well defined cell bodies were observed for NPY thus, for this peptide positive fibers were evaluated in the ARC, DMH and PVN. Also positive fibers for α -MSH were evaluated in the DMH and PVN.

Three representative coronal sections (anterior, medial and posterior region) of each structure ($n = 3$) were selected according with the stereotaxic atlas³³. For the PVN sections selected correspond to Bregma -1.60 and -1.88; for the ARC, DMH, and LH area sections correspond to Bregma -2.30 and -3.30.

Images were examined under a light microscope (Nikon, Elipse E600) and captured at a 10X magnification. Immuno-reactive (IR) cells were counted using a computerized image analysis system (Meta Vue series 4.5; Universal Imaging Corporation). NPY and α -MSH –IR fibers were evaluated with optical density using the software ImageJ (NIH). The area of each nucleus was outlined to evaluate the relative optical density (OD) defined according to values calibrated with a ¹⁴C scale. We used anatomical references to outline the corresponding nuclei.

An observer blind to the rat's nutritional conditions evaluated the positive neurons and fibers for ORX, NPY and α -MSH. Total number of cells or the value of OD of the fibers were obtained bilaterally from three consecutive slices and averaged for each animal and per group.

2.7 Statistical analysis

Body fat pad weights and food ingestion were transformed into proportional values according to individual's body weight. Blood glucose concentration, values of body and fat pad weights, food ingestion, cell number and the arbitrary OD of fibers in each nucleus were classified for group and reported as mean \pm standard error of the mean (sem). Student's *t* test for independent samples was used to compare the control and the malnourished groups at P25 and P55. For compare the control and two rehabilitated groups at P90 a one-way ANOVA with group as independent variable was used, followed by a *post hoc* Tukey multicomparison analysis, the *p* level was set at $P \leq 0.05$ considered as statistically significant. The statistical analysis was performed using the program Statistica (version 4.5, 1993) and graphics were elaborated using Sigma Plot 2001.

3. RESULTS

3.1 Body weight, food consumption, fat pads weight and blood glucose after IPB of glucose

Malnutrition in both stages of life induced a significantly low body weight (**Table 1**) and a slow increase in the body weight ratio. From P2 to P25 control rats increased their body weight ~ 505 % while in the same interval MGL increased their body weight ~ 376 %. Likewise, in the interval between P25 to P55 control rats augmented ~ 466 % their body weight while MPW rats augmented ~ 138 %.

After nutritional rehabilitation both groups MGL-R and MPW-R, remained with lower body weight as compared with their well nourished controls (**Table 1**). The one-way ANOVA indicated a statistical difference between C and rehabilitated groups in body weight ($F_{(2, 9)} = 134.14$; $p = 0.001$). Although at 90 days MGL-R and MPW-R rats remained with low body weight than their C counterparts, the ratio of body weight

increased during the rehabilitation period and represented an increase of ~1185 % for MGL-R (from P25 to P90) as compared with C group (~776 %) and an increased of ~372.7 % for MPW-R (from P55 to P90) in contrast to ~164.3 % for C rats.

During the rehabilitation period the MGL-R and MPW-R rats consumed in absolute terms the same amount of food than their C group (C: 23.14 ± 0.44 g; MGL: 22.80 ± 0.45 g and MPW: 23.70 ± 0.35 g, respectively; $n = 4$). However, when ingested food was adjusted for their body weight, C rats consumed a daily proportion of 7.5 %, while MGL-R consumed 11.9 % and MPW-R 13.9 %, indicating hyperphagia in both rehabilitated groups.

In both malnourished groups at P25 or P55 the weights of the abdominal, retroperitoneal and epididymal fat pads were statistically lower compared with their well nourished controls. However, when it was adjusted as the proportion of their body weight, the percentage was similar for all groups (**Table 1**). At P90, the end of the balanced diet rehabilitation period, the absolute weight of the three fat pads for the MGL-R and MPW-R was similar to their controls. For the rehabilitated groups the one-way ANOVA revealed no significant difference for the absolute weight among groups (abdominal: $F_{(2, 9)} = 1.79$, NS; retroperitoneal: $F_{(2, 9)} = 2.17$, NS; epididymal: $F_{(2, 9)} = 2.40$, NS). However, the adjusted weights of the adipose tissues in proportion to the body weight resulted in a higher percentage of fat in both rehabilitated groups, indicating that these rats accumulate more fat compared with C animals (**Table 1**).

Two hours after intraperitoneal glucose injection, MGL and MPW rats displayed significantly higher glucose values as compared to their C rats. After nutritional rehabilitation MGL-R and MPW-R rats showed similar blood glucose values as the control group ($F_{(2, 9)} = 0.89$; $p = \text{NS}$; **Table 1**).

Table 1: Effects of malnutrition during gestation and lactation, from weaning to P55 or rehabilitation at P90 on body weight, blood glucose, absolute weight and proportional to body weight of adipose tissue, two hours after intraperitoneal glucose injection.

AGE IN DAYS VARIABLE	GROUPS						
	25		55		90		
	C	MGL	C55	MPW	C	MGL-R	MPW-R
Body weight (g)	49 ± 2	22 ± 1*	230 ± 3	68 ± 2*	377 ± 7	259 ± 5*	252 ± 6*
Blood glucose (mg/ dl)	66 ± 5	159 ± 14*	106 ± 4	205 ± 18*	126 ± 27	104 ± 8	139 ± 16
Abdominal fat (g)	0.12 ± 0.00	0.05 ± 0.00*	1.32 ± 0.1	0.32 ± 0.04*	3 ± 0.3	2.42 ± 0.04	2.5 ± 0.1
(%)	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.57 ± 0.03	0.47 ± 0.06	0.75 ± 0.1	0.93 ± 0.03	0.99 ± 0.02
Retroperitoneal fat (g)	0.07 ± 0.00	0.04 ± 0.00*	0.77 ± 0.1	0.25 ± 0.02*	2.22 ± 0.1	2.15 ± 0.1	2 ± 0.04
(%)	0.15 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.38 ± 0.03	0.58 ± 0.01	0.83 ± 0.03	0.79 ± 0.01
Epididymal fat (g)	0.10 ± 0.01	0.05 ± 0.00*	1.47 ± 1.2	0.35 ± 0.1*	2.27 ± 0.1	2.07 ± 0.04	2.22 ± 0.1
(%)	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.64 ± 0.1	0.53 ± 0.14	0.56 ± 0.01	0.80 ± 0.02	0.88 ± 0.04

Values are means ± sem; n = 4, * p ≤ 0.001; controls different to malnourished or rehabilitated groups.

3.2 Immunoreactive cells and fibers in hypothalamic nuclei

In the LH the ORX-IR positive cells were similar for control and malnourished rats at P25 and P55, as well as in rehabilitated groups. No statistical differences were observed (Figure 1).

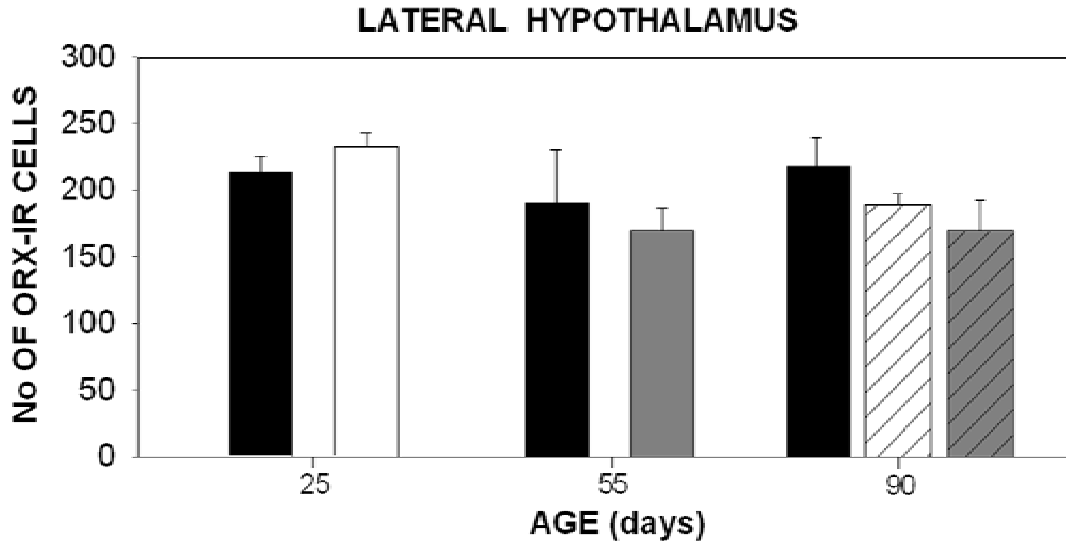


Figure 1. Mean number of ORX-IR neurons in the LH ($n = 3$ per nutritional group \pm sem) 2 hours after intraperitoneal glucose injection in male rats malnourished from gestation to lactation (MGL; white bars), malnourished from weaning to P55 (MPW; gray bars) and their well nourished controls (C; black bars), and 90 day old rehabilitated with a balanced diet (MGL-R; striped-white bars and MPW-R striped-gray bars) and their well nourished controls (black bars). No statistical differences were observed between C vs malnourished or rehabilitated groups.

Early malnutrition (MGL) induced a statistically significant higher relative OD of NPY-IR fibers in the ARC and PVN (Figure 2A and B), while post-weaning malnutrition did not induce any effect on the NPY-IR fibers. Balanced diet rehabilitation reversed the effects observed in MGL rats, and no differences were observed between control and MGL-R in the ARC ($F_{(2,6)} = 0.64$; $p = \text{NS}$) and PVN ($F_{(2,6)} = 1.63$; $p = \text{NS}$). In the DMH no effect was observed in the relative OD of NPY-IR fibers in MGL and MPW groups, however after nutritional rehabilitation the MPW-R rats displayed significant increased NPY-IR fibers (Figure 2C). The analysis of one-way ANOVA revealed a significant effect at P90 ($F_{(2,6)} = 27.65$; $p = 0.001$).

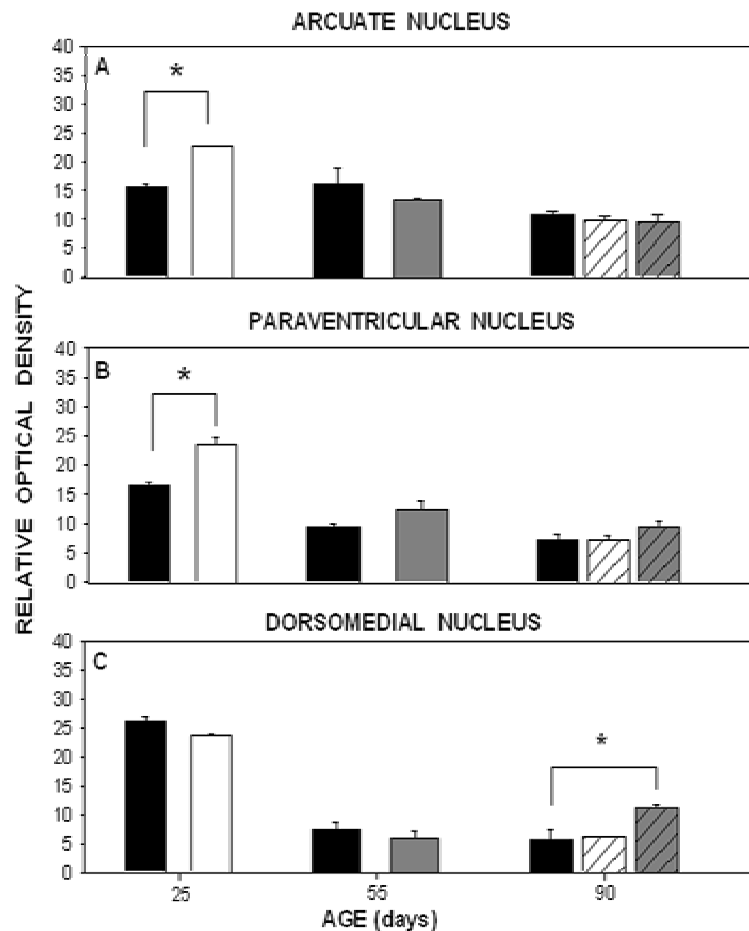


Figure 2. Relative optical density of NPY at the level of ARC, PVN and DMH hypothalamic nuclei as determined by immunohistochemistry in C, MGL, MPW, MGL-R and MPW-R groups, two hour after intraperitoneal glucose injection. Data are expressed as mean \pm sem (n = 3 per nutritional group). Asterisk indicate significant differences between C vs MGL group (P = 0.01 for ARC nucleus and P = 0.04 for PVN); and between C vs MPW-R in DMH nucleus (P = 0.001). For more details of groups see **figure 1**

The number of α -MSH-IR cells in the ARC was not different between control and the MGL group. However, a significant reduction of the α -MSH-IR fibers was detected in the PVN and DMH (**Figure 3A, B and C; Figure 4A and B**). In the MPW rats a significant decreased number of α -MSH-IR cells were observed in the ARC as well as decreased α -MSH-IR fibers in the PVN (**Figure 4C and D**) and DMH nuclei (**Figure 3A, B and C**). At P90 after balanced diet rehabilitation, MGL-R and MPW-R groups showed no significant differences from the control in the ARC α -MSH-IR cell number ($F_{(2, 6)} = 1.32$; p = NS) or OD fibers in the DMH ($F_{(2, 6)} = 4.02$; p = NS) (**Figure 3A and C**). In contrast, long-lasting decreased of α -MSH-IR fibers in the PVN as compared with their well nourished C group were observed in both rehabilitated groups (**Figure 3B; Figure 5A, B and C**). The analysis with the one-way ANOVA indicated a significant effect at P90 ($F_{(2, 6)} = 12.14$; p = 0.01).

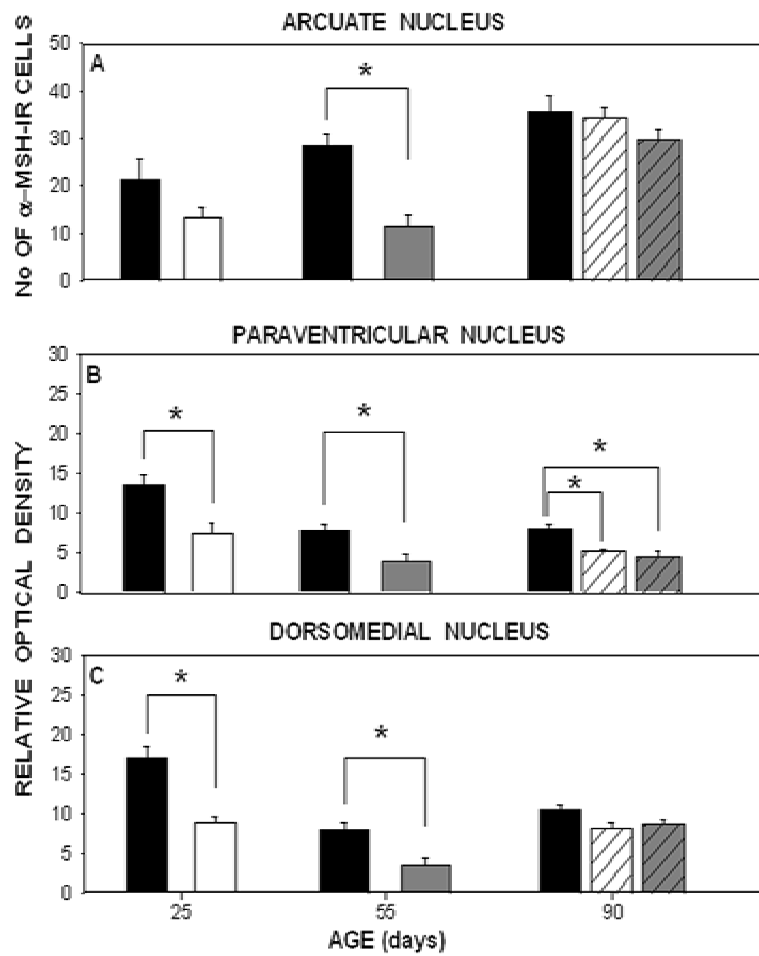


Figure 3. Mean number (\pm sem; $n = 3$ per nutritional group) α -MSH-IR neurons in the ARC nucleus and relative optical density of α -MSH-IR fibers expressed in the PVN and DMH nuclei in C, MGL, MPW, MGL-R and MPW-R groups, two hour after intraperitoneal glucose injection. * indicates statistical difference: In ARC: C vs MPW, $p = 0.006$; PVN: C vs MGL and C vs MPW, $p = 0.03$; DMH: C vs MGL, $p = 0.008$; C vs MPW, $p = 0.02$. For rehabilitated groups, C vs MGL-R, $p = 0.02$; C vs MPW-R, $p = 0.008$. For more details of groups see **figure 1**.

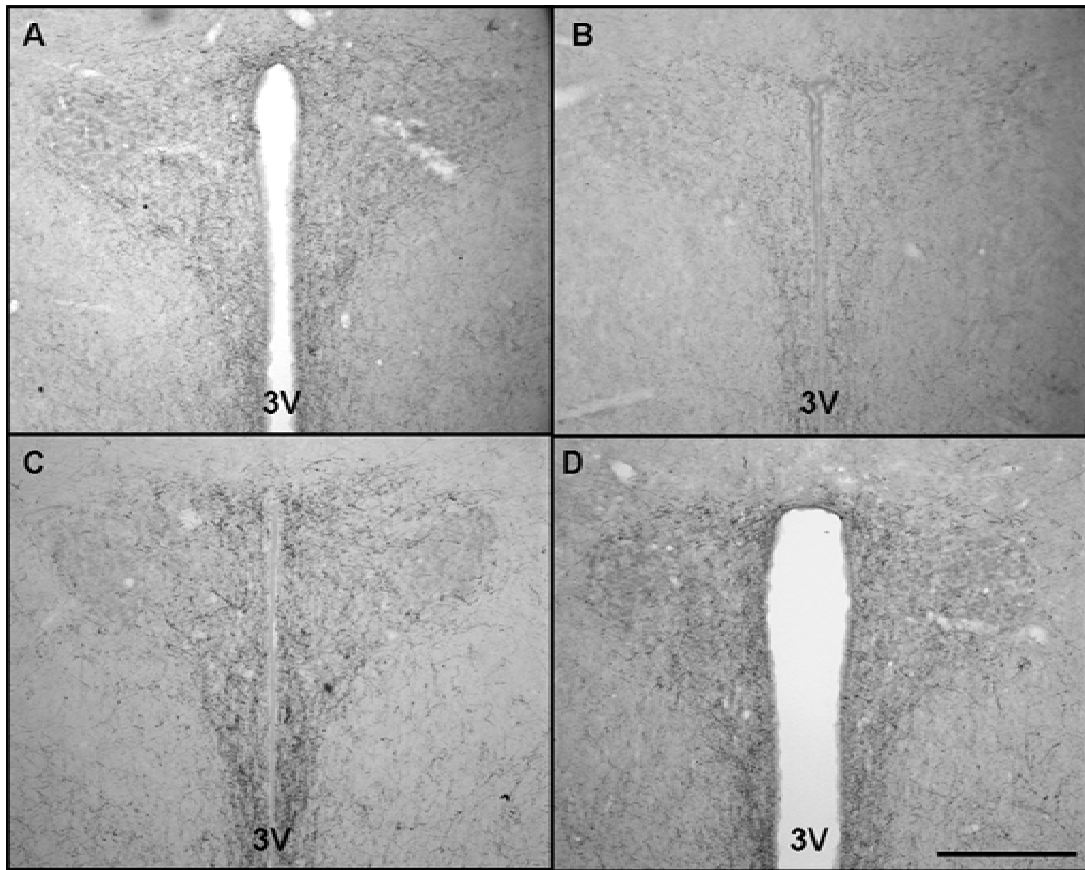


Figure 4. Photomicrographs illustrating α -MSH-IR fibers in representative hypothalamic coronal sections of PVN in control groups (left panels A and C, respectively) and malnourished rats MGL and MPW (right panels B and D, respectively) at P25 and P55. Scale bar corresponds to 100 μ m. Third ventricle, 3V.

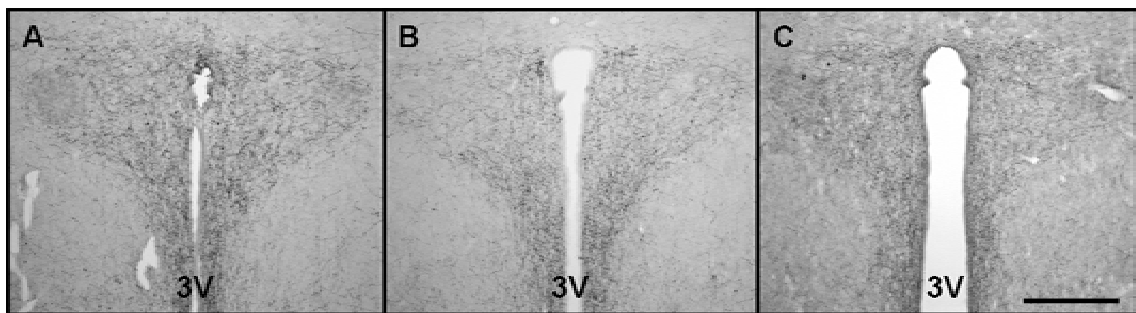


Figure 5. Representative immunohistochemical staining of positive fibers for α -MSH in the PVN nucleus in C and rehabilitated rats at P90. A correspond to control group, B to MGL-R and C to MPW-R. Scale bar corresponds to 100 μ m. Third ventricle, 3V.

4. DISCUSSION

In agreement with our previous studies and with others^{6, 7, 34, 35}, we found that low protein malnutrition during gestation and lactation as well as from weaning to P55 induced a long-lasting slowdown growth on the offspring. This lead to maintain low body weight of MGL-R and MPW-R rats until P90 in spite of a balanced diet nutritional rehabilitation. The effect observed pointing out the importance of both periods for the correct growing. Also, during the rehabilitation period malnourished animals, compared with their well nourished control rats, exhibited a faster ratio of body weight increase, in spite of ingesting similar amounts of food per day. However, when adjusting the amount of ingested food to their body weight, a process of hyperphagia became evident.

Some studies indicate that the consequence of early detrimental metabolic conditions followed by the new adequate nutritional environment leads to latent obesity that can only be unmasked when animals are exposed to carbohydrates and/ or lipids rich diet^{36, 37}. This is a manifestation of the thrifty phenotype resulting from an early deficient nutritional environment^{38, 39}.

We demonstrate that malnourished animals have low weight of fat pads compared with well nourished controls, however when weight of adipose tissues was expressed as proportion of the animals body weight it was significantly higher, indicating propensity to accumulate fat in early malnourished rats. This same process is consistent with previous studies^{40, 41, 42, 43}. In spite that MGL-R and MPW-R rats did not show a declared obesity compared with C groups, the increased proportion of fat depots may have contributed to the higher ratio of body weight increase. It is suggested that increased insulin receptor expression and higher glucose uptake are may be the causes of increased fat stores that promote obesity².

In our study, MGL and MPW rats exhibited significantly higher blood glucose values two hours after glucose administration, as compared to their well nourished controls. In malnourished animals during gestation and lactation low insulin production has been described as a reduction in pancreatic vascularization and islet size⁴⁴, as well as decreased number of pancreatic β -cells⁴⁵. Also, we have previously reported that MGL and MPW exhibit low insulin values after a glucose tolerance test⁶ and for the MPW this may be related to pancreatic alterations in the restructuring post-natal window⁴⁶. At P90 after nutritional balance rehabilitation, MGL-R and MPW-R rats displayed similar glucose values as the controls, suggesting the possibility of metabolic adjustments in later stages of life. Such effects were previously reported by Hales *et al* 1996⁴⁷ for rehabilitated rats, mediated by increased insulin sensitivity in muscle and adipose tissue after nutritional rehabilitation.

ORX in LH area are involved in the control of food intake and body weight, and also are sensitive to changes in blood glucose^{48, 49}. Glucose or food inhibit ORX expression, while hypoglycemia or fasting increase their expression⁵⁰. In the current study, two hours after glucose injection, the immunopositive cells to ORX in the LH area were similar for malnourished or rehabilitated rats with respect to the C groups, in spite of increased values of blood glucose observed in MGL and MPW rats.

Remmers *et al* 2008⁵¹, demonstrates that after early undernutrition, by increasing pups during lactation, the ORX system was not affected. Contrasting a permanent increased expression of ORX peptide was observed when peri-natal fat rich diet was provided to the mothers and offspring early in life⁵². With our results and previous⁵¹ we can conclude that the ORX system is refractory to a deficient diet at any time of onset, or that the ORX system is highly adaptive to deficient nutritional insults.

Insulin and leptin are important peripheral signals for the correct development of the brain during early life spurt growth⁵³. Besides, both hormones are known to be relevant regulators of hypothalamic NPY and α -MSH secretion⁵⁴. Previous reports indicate that malnutrition early in life induces decreased production of leptin and this alters the development of the ARC nucleus and the expression of NPY and α -MSH neuropeptides^{9, 55}. Such results however are controversial, since Plagemann *et al* 2000⁸ reported less numerical densities of neuron positive for NPY in the ARC with normal values of leptin; and also with normal leptin values, the same numerical densities of neuropeptide in the ARC and medial eminence complex and high density of fibers that arrive to the PVN were also reported by Plagemann *et al* 2000²¹. In contrast Delahaye *et al* 2008⁹ found with low leptin levels, normal NPY and low α -MSH expression in ARC nucleus in the weanling rats, also this study showed normal NPY neuron nerve fiber projection ARC-PVN but decreased α -MSH.

In this study we observed in the MGL group an up-regulation of NPY in the ARC and PVN, while late malnutrition (MPW) did not affect this system. In contrast α -MSH expression in the PVN and DMH was decreased after both stages of malnutrition (MGL and MPW). Malnutrition induces low leptin and insulin levels^{6, 9}, and is possible that in MGL rats the low hormonal values resulted in a deficient development of both systems. It is important to note that the drastically reduced surge of plasma leptin is accompanied by marked alterations of the hypothalamic neuropeptide system maturation in neonates at post-natal day 14⁹ and thus late malnutrition did not modify this process. Thus the differential effects observed in the NPY-IR and α -MSH-IR between the MGL and MPW rats respect their C groups, may be due to the different stage of vulnerability of the hypothalamus to malnutrition. While the NPY system is fully developed and matures at the first post-natal weeks⁵³, the α -MHS system is apparently not fully mature before weaning and is preferentially affected by a deficient diet and possibly low leptin levels as reported by Delahaye *et al* 2008⁹.

After nutritional rehabilitation, at P90, we observed a differential long-lasting effect by malnutrition. The NPY-IR response was similar to the C group while α -MSH-IR remained low in the PVN and a tendency to low values was also observed in the DMH in both rehabilitated groups. Breton *et al* 2009⁵⁶ have reported increased expression of POMC mRNA during fasting condition, with no changes in the NPY system after nutritional rehabilitation in pre-natal undernourished rats. In contrast, Remmers *et al* 2008⁵¹ described in adult rehabilitated animals low mRNA levels of α -MSH in ARC nuclei while NPY remained unchanged under basal condition. For our study a determining factor might be the glucose and insulin concentrations, associated with the condition after which the animals were evaluated (two hours after glucose bolus in the present study). In addition, different mechanisms that are thought to influence hypothalamic appetite-satiety programming during the peri-natal and early life are largely unknown and might differ depending on the models used.

We do not know exactly what is the explanation and meaning of the increased NPY-IR in the DMH of MPW-R rats and the low α -MSH expression in both malnourished and rehabilitated groups, however it is possible that both are involved in the deregulation of food intake reported here and by other authors^{42, 56}. Also, it is possible that the increased of NPY-IR in the DMH of MPW-R is associated with a propensity to develop obesity as reported by Bi *et al* 2001⁵⁷ and 2003⁵⁸ in genetic obesity models and the α -MSH-IR down regulation observed in the PVN of rehabilitated groups is related probably with decreased ARC projections. It is clear that the ARC-PVN circuit is fundamental in the transmission of the satiety message in the hypothalamus⁵⁹ and is possible that this system is affected in these animals.

Present results are in agreement with previous observations indicating that, early malnutrition affects hypothalamic development^{8, 21}, induces hyperphagia and a masked obesity (marked by increased percentage of body fat and food intake)⁴². The obesity is observed in adult life in spite of balance diet consumption. This study provides evidence that post-weaning malnutrition also induces significant alteration of the α -MSH-PVN system that remains until adulthood. The decrease of the α -MSH expression in the PVN induces an unbalance in the hungry/satiated feedback⁶⁰ and may underlie the hyperphagia and a low metabolic rate¹¹ favoring body weight gain in rehabilitated rats. While this adaptation is in favor of short-term survival probably leads to long-term effects related with metabolic diseases in adult life obesity. Although the induction of obesity is a multifactorial process, the diversity of animal models and conditions with a common endpoint might suggest some shared pathways. Several factors such as food ingestion, adipose tissue, metabolic and hypothalamic signals are undoubtedly important, but the plasticity of the hypothalamus in late development appears to be a crucial determinant for set-points of appetite and metabolism. Also, our data suggest that maternal or late malnutrition differently programs the long-term appetite-regulatory system of offspring, especially the response of POMC neurons to energy status and food intake.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to Biol. Teresa Solis-Salazar for technical assistance. The present project was supported by grants DGAPA PAPIIT UNAM IN-203803 and IN-203907. MCMS received PhD fellowship by CONACyT and DGEP, posgrado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

6. REFERENCES

- 1.- Roseboom TJ, van der Meulen JH, Osmond C *et al* Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944-45. *Heart*. 2000; 84: 595-598.
- 2.- Remacle C, Bieswal F, Reusens B. Programming of obesity and cardiovascular disease. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004; 28: S46-S53.
- 3.-Yajnik CS, Deshmukh US. Maternal nutrition, intrauterine programming and consequential risks in the offspring. *Rev Endocr Metab Disord*. 2008; 9: 203-211.
- 4.- Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE, Ekizoglou S *et al* The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction. *Br J Nutr*. 2003; 90: 815-822.
- 5.- McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev*. 2005; 85: 571-633.
- 6.- Miñana-Solis MC, Escobar C. Post-weaning protein malnutrition in the rat produces short and long term metabolic impairment, in contrast to earlier and later periods. *Int J Biol Sci*. 2008; 4: 422-432.
- 7.- Miñana-Solis MC, Angeles-Castellanos M, Buijs R *et al* Altered FOS immunoreactivity in the hypothalamus after glucose administration in pre and post-weaning malnourished rats. *Nutr Neurosci* (accepted).
- 8.- Plagemann A, Harder T, Rake A *et al* Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutr*. 2000; 130: 2582-2589.
- 9.- Delahaye F, Breton C, Risold PY *et al* Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology*. 2008; 149: 470-475.
- 10.- Havel PJ, Hahn TM, Sindelar DK *et al* Effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the hypothalamic melanocortin system and muscle uncoupling protein 3 expression in rats. *Diabetes*. 2000; 49: 244-252.

- 11.- Gao Q, Horvarth TL. Neuronal control of energy homeostasis. *FEBS Lett.* 2008; 582: 132-141.
- 12.- Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity—a review. *Neuropeptides.* 2006; 40: 375-401.
- 13.- Jolicœur FB, Bouali SM, Fournier A *et al* Mapping of hypothalamic sites involved in the effects of NPY on body temperature and food intake. *Brain Res Bull.* 1995; 36: 125-129.
- 14.- Sakurai T. Roles of orexins and orexin receptors in central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2006; 5: 313-325.
- 15.- Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci.* 2005; 8: 571-578.
- 16.- Ao Y, Wu S, Go VL *et al* Maintaining euglycemia prevents insulin-induced Fos expression in brain autonomic regulatory circuits. *Pancreas.* 2005; 31: 142-147.
- 17.- Chang GO, Karatayev O, Davydova Z *et al* Glucose injection reduces neuropeptide Y and agouti-related protein expression in the arcuate nucleus: a possible physiological role in eating behavior. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005; 135:69-80.
- 18.- Ibrahim N, Bosch MA, Smart JL *et al* Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology.* 2003; 144: 1331-1340.
- 19.- Cai XJ, Evans ML, Lister CA *et al* Hypoglycemia activates orexin neurons and selectively increases hypothalamic orexin-B levels: responses inhibited by feeding and possibly mediated by the nucleus of the solitary tract. *Diabetes.* 2001; 50: 105-112.
- 20.- Terroni PL, Anthony FW, Hanson MA *et al* Expression of agouti-related peptide, neuropeptide Y, pro-opiomelanocortin and the leptin receptor isoforms in fetal mouse brain from pregnant dams on a protein-restricted diet. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005 ; 140: 111-115.
- 21.- Plagemann A, Waas T, Harder T *et al* Hypothalamic neuropeptide Y levels in weaning offspring of low-protein malnourished mother rats. *Neuropeptides.* 2000; 34: 1-6.
- 22.- Marty N, Dallaporta M, Thorens B. Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology.* 2007; 22: 241-251.
- 23.- Parton LE, Ye CP, Coppari R *et al* Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature.* 2007; 449: 228-232.
- 24.- Levin BE, Dunn-Meynell AA, Routh VH. Brain glucose sensing and body energy homeostasis: role in obesity and diabetes. *Am J Physiol.* 1999; 276: R1223-R1231.
- 25.- Schwartz MW, Porte D Jr. Diabetes, obesity, and the brain. *Science.* 2005; 307: 375-379.
- 26.- Kim EM, O'Hare E, Grace MK *et al* ARC POMC mRNA and PVN alpha-MSH are lower in obese relative to lean Zucker rats. *Brain Res.* 2000; 862: 11-16.
- 27.- Fu M, Li X, Zhang M *et al* Increased expression of neuropeptide Y and its mRNA in STZ-diabetic rats. *Chin Med J.* 2002; 115: 690-695.
- 28.- Havel PJ. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med.* 2001; 226: 963-977.
- 29.- Beck B, Richy S, Dimitrov T *et al* Opposite regulation of hypothalamic orexin and neuropeptide Y receptors and peptide expressions in obese Zucker rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 286: 518-523.
- 30.- Cai XJ, Lister CA, Buckingham RE *et al* Down-regulation of orexin gene expression by severe obesity in the rats: studies in Zucker fatty and Zucker diabetic fatty rats and effects of rosiglitazone. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000; 77: 131-137.
- 31.- Miñana-Solis MC, Escobar C. Increased susceptibility to metabolic alterations in young adult females exposed to early malnutrition. *Int J Biol Sci.* 2006; 3: 12-19.
- 32.- Díaz-Cintra S, González-Maciél A, Morales MA *et al* Protein malnutrition differentially alters the number of glutamic acid decarboxylase-67 interneurons in dentate gyrus and CA1-3 subfields of the dorsal hippocampus. *Exp Neurol.* 2007; 208: 47-53.
- 33.- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press. 1998.
- 34.- Cintra L, Galván A, Díaz-Cintra S *et al* Protein malnutrition on suprachiasmatic nucleus cells in rats of three ages. *Bol Estud Med Biol.* 1994; 42: 11-19.
- 35.- Resnick O, Morgane PJ, Hasson R *et al* Overt and hidden forms of chronic malnutrition in the rat and their relevance to man. *Neurosci Biobehav Rev.* 1982; 6: 55-75.
- 36.- Bieswal F, Ahn MT, Reusens B *et al* The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity.* 2006; 14: 1330-1343.
- 37.- Desai M, Byrne CD, Meeran K *et al* Regulation of hepatic enzymes and insulin levels in offspring of rat dams fed a reduced-protein diet. *Am J Physiol.* 1997; 273: G899-904.
- 38.- Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 1992; 35: 595-601.

- 39.- Petry CJ, Ozanne SE, Hales CN. Programming of intermediary metabolism. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 185: 81-91.
- 40.- Dollet JM, Beck B, Villaume C *et al* Progressive adaptation of the endocrine pancreas during long-term protein deficiency in rats: effects on blood glucose homeostasis and on pancreatic insulin, glucagon and somatostatin concentrations. *J Nutr.* 1985; 115: 1581-1588.
- 41.- Gosby AK, Maloney CA, Phuyal JL *et al* Maternal protein restriction increases hepatic glycogen storage in young rats. *Pediatr Res.* 2003; 54: 413-418.
- 42.- Orozco-Sólis R, Lopes de Souza S, Barbosa Matos RJ *et al* Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav.* 2008; 96: 481-492.
- 43.- Thompson NM, Norman AM, Donkin SS *et al* Prenatal and postnatal pathways to obesity: different underlying mechanisms, different metabolic outcomes. *Endocrinology.* 2007; 148:2345-2354
- 44.- Snoeck A, Remacle C, Reusens B *et al* Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate.* 1990; 57: 107-118.
- 45.- Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B *et al* Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes.* 1991; 40: 115-120.
- 46.- Aguayo-Mazzucato C, Sanchez-Soto C, Godinez-Puig V *et al* Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS ONE.* 2006; 20: e35.
- 47.- Hales CN, Desai M, Ozanne SE *et al* Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem Soc Trans.* 1996; 24: 341-350.
- 48.- Bernardis LL, Bellinger LL. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 1996; 20:189-287.
- 49.- Orsini JC, Armstrong DL, Wayner MJ. Responses of lateral hypothalamic neurons recorded in vitro to moderate changes in glucose concentration. *Brain Res Bull.* 1992; 29:503-505.
- 50.- Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J *et al* Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes.* 1999; 48: 2132-2137.
- 51.- Remmers F, Verhagen LA, Adan RA *et al* Hypothalamic neuropeptide expression of juvenile and middle-aged rats after early postnatal food restriction. *Endocrinology.* 2008; 149:3617-3625.
- 52.- Chang GQ, Gaysinskaya V, Karatayev O *et al* Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J Neurosci.* 2008; 28:12107-12119.
- 53.- Grove KL, Smith MS. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiol Behav.* 2003; 79: 47- 63.
- 54.- Gerozissis K. Brain insulin and feeding: a bi-directional communication. *Eur J Pharmacol.* 2004; 490: 59- 70.
- 55.- Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH *et al* Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology.* 2005; 146: 4211-4216.
- 56.- Breton C, Lukaszewski MA, Risold PY *et al* Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296: E462-E472.
- 57.- Bi S, Ladenheim EE, Schwartz GJ *et al* A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001; 281: R254-R260.
- 58.- Bi S, Robinson BM, Moran TH. Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 285: R1030-R1036.
- 59.- Millington GW. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr Metab.* 2007; 4: 18.
- 60.- Kalra SP, Dube MG, Pu S *et al* Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev.* 1999; 20: 68-100.

8. DISCUSIÓN GENERAL

La disminución del peso corporal es indicador anatómico de los efectos de la malnutrición durante el crecimiento del individuo. De hecho, dependiendo del déficit de peso corporal es como se clasifica a groso modo el grado de malnutrición (Icaza & Béhar, 1981; Secretaría de Salud y Asistencia; NOM-031-SSA2-1999).

En el presente estudio se encontró que la malnutrición proteica induce retraso en el crecimiento, cuando ésta se lleva a cabo durante los periodos críticos del desarrollo es decir, durante la gestación y la lactancia. Esta condición también ha sido encontrada en otros trabajos (Granados-Rojas *et al* 2004; Resnick *et al* 1982). Se ha atribuido principalmente a que la ingesta inadecuada de la madre privio y/o durante el embarazo, tiene como resultado que ésta carezca de la cantidad de reservas energéticas adecuadas y disponibles para que los críos se desarrollen de manera óptima durante la gestación y por tanto al nacimiento presentan bajo peso (Resnick *et al* 1982).

Durante el amamantamiento la madre malnutrida no produce leche en cantidad y calidad suficiente para alimentar a la camada de manera adecuada (Bautista *et al* 2008; Ronayne De Ferrer & Sambucetti, 1993). Esto también induce o mantiene, como en este protocolo, el retraso en el crecimiento, dando como resultado que el peso de los críos malnutridos sea inferior al de sus controles nutricionales al destete.

Este trabajo demuestra por primera vez que la malnutrición del destete hasta el día P55, al igual que durante los periodos críticos, produce retraso en el crecimiento. Esto se vio reflejado en el déficit de peso corporal semejante en proporción, a lo observado con las ratas malnutridas durante la gestación y la lactancia.

Estudios como los de Lobe *et al* 2006; Pucciarelli & Goya, 1983; y Reichling & German 2000, han demostrado que la etapa de la pubertad es muy importante para el correcto desarrollo y maduración de los huesos y de los músculos. En el presente experimento al inducir la malnutrición a las ratas del destete al día P55, abarcamos la etapa de la madurez sexual; durante la cual los animales incrementan su peso y su talla de manera considerable. La restricción nutricional afectó este proceso de crecimiento. Por ello, proponemos a esta etapa como periodo “vulnerable” a las condiciones nutricionales que afecta el incremento de peso corporal. En contraste, las ratas malnutridas del día P90 al día P120, mostraron pérdida del peso corporal, que no permanece a largo plazo.

La rehabilitación nutricional no logró compensar el déficit inicial de peso por lo que aún a los 90 y 180 días las ratas malnutridas durante gestación y lactancia o del destete al día P55 mantuvieron su peso por debajo de los controles. Un estudio previo en nuestro laboratorio demostró que la tasa de incremento de peso es mayor en estos animales que en sus controles nutricionales, pero no logran alcanzarlos debido a su déficit inicial (Miñana-Solis & Escobar 2006).

Otros estudios demuestran que los animales malnutridos durante las edades tempranas del desarrollo crecen más lentamente pero por más tiempo que los animales alimentados balanceadamente (Reichling & German, 2000). Nuestros resultados coinciden entonces con estudios previos en que se muestra que a pesar de la ingesta de la dieta balanceada los animales no logran rehabilitarse al menos en cuanto al peso corporal se refiere (Desai *et al* 1996; Resnick *et al* 1982).

La malnutrición induce en el páncreas cambios tanto a nivel anatómico como fisiológico. Animales malnutridos durante los periodos críticos del desarrollo presentan reducción de la vascularización, del número de islotes pancreáticos y de células β

(Berney *et al* 1997; Snoeck *et al* 1990). La disminución en la secreción de insulina es otro efecto debido a la malnutrición temprana (Barbosa *et al* 2002).

En el presente estudio encontramos que después de la PTG, las ratas malnutridas durante las etapas críticas del desarrollo o a partir del destete, presentan hiperglucemia asociada probablemente a la secreción disminuida de insulina.

Latorraca *et al* 1998, reportan que bajo condiciones *ad libitum* de alimentación, las ratas malnutridas muestran valores de glucosa semejantes al control, a pesar de presentar disminución en la secreción de insulina. En contraste, Gamallo *et al* 1989, encuentran niveles disminuidos de glucosa en *ad libitum* y Ozanne *et al* 1996, valores normales de insulina bajo condiciones de ayuno.

La diferencia entre nuestros datos y los de los autores mencionados, se debe probablemente a la condición metabólica bajo la cual fueron obtenidas las mediciones. En nuestro estudio la tendencia de los bajos niveles de insulina en ratas MGL en comparación con los controles nutricionales, puede ser la causa de la hiperglucemia dos horas después del bolo de glucosa.

Los animales malnutridos a partir del destete y hasta el día P55, mostraron hiperglucemia que se relaciona claramente, con la producción significativamente disminuida de insulina. Estos datos contradicen a los efectos clásicos de la programación del páncreas apoyados por los trabajos de Garofano *et al* 1997 y Snoeck *et al* 1990. En ellos, se postula que la etapa crítica para el desarrollo del páncreas es durante la gestación y la lactancia. Sin embargo, Aguayo-Mazzucato, *et al* 2006, demuestran que en el páncreas se dan intensos cambios estructurales y funcionales durante la etapa del destete (primer mes de vida). Las células β así como las α tienen importantes modificaciones que influyen en la secreción tanto de la insulina como del glucagón.

En nuestro estudio es probable que al abarcar la etapa del destete hasta la pubertad de la rata bajo la condición de malnutrición, afectemos la última etapa de remodelación del páncreas, ya que tanto la producción de insulina como de glucagón se ve disminuida en estos animales. Sin embargo, se requieren estudios morfológicos para determinar si con la malnutrición tardía se está afectando el número celular así como también la vascularización del órgano. Así mismo, es importante estudiar los mecanismos involucrados en estas alteraciones, que pudieran relacionarse con la baja producción de insulina y de glucagón.

Por otro lado, Dollet *et al* 1985, demuestran que a lo largo de la vida (en la rata), se llevan a cabo al menos tres etapas durante las cuales los valores de regulación de la glucosa así como de la insulina y del glucagón varían. Uno de estos periodos ocurre durante la etapa joven-adulta (tres meses de edad), presentándose estos cambios de manera más notoria en los animales malnutridos. Es posible que estos reajustes metabólicos contribuyan también a los resultados obtenidos durante esta etapa en los animales malnutridos tempranamente.

La malnutrición en la vida adulta no tuvo ningún efecto en el metabolismo de la glucosa, en la producción de insulina o de glucagón. Es probable que en estos animales el páncreas se encuentre totalmente desarrollado y no afectemos ni la morfología ni la fisiología del mismo, y a su vez que existan mecanismos compensatorios para mantener niveles normales tanto de glucemia como hormonales.

La condición de malnutrición ha sido considerada como agente estresor el cual, origina la pérdida de la homeostasis. Esto induce en el organismo cambios fisiológicos para poder sobrevivir bajo estas condiciones (Bertram & Hanson, 2002).

Los glucocorticoides producidos en las glándulas adrenales son señales importantes que intervienen en la respuesta al estrés. Estos regulan la síntesis de catecolaminas que a su vez participan en la homeostasis de los hidratos de carbono y de las grasas (Barth *et al* 2007; Duncan *et al* 2007; Tsigos & Chrousos 2002). La elevación plasmática de los niveles de catecolaminas, induce la producción de glucosa a través de la gluconeogénesis y de la lipólisis principalmente (Barth *et al* 2007; Duncan *et al* 2007).

Durante el desarrollo estas hormonas son importantes ya que promueven la diferenciación y maduración de los órganos y tejidos como el páncreas, hígado y cerebro (Gesina *et al* 2006; Kapoor *et al* 2006; Mayor & Cuezva 1985).

Durante los periodos críticos del desarrollo la malnutrición induce en la madre elevación de la secreción de glucocorticoides y catecolaminas, que pasan a través de la placenta hacia el feto en desarrollo e induce, modificaciones a nivel anatómico y fisiológico en el crío (Gesina *et al* 2006; de Moura & Passos, 2005; Langley-Evans *et al* 1996). Los efectos inducidos por la elevación de las hormonas en la vida temprana, se mantienen a largo plazo y se ha relacionado con alteraciones metabólicas como la obesidad y la hipertensión (Petry *et al* 2000; Tsigos & Chrousos 2002).

En el presente estudio no se midió la concentración de glucocorticoides o catecolaminas. Sin embargo, ya que los animales MGL y MPW se encuentran bajo condiciones de estrés, es posible que la hiperglucemia observada en estas ratas se deba a la movilización a la circulación de la glucosa debido a estas señales hormonales. En las ratas MA a pesar de que no se observó incremento en la glucosa, sería de gran utilidad también evaluar las concentraciones de las hormonas para determinar el grado de estrés que induce la malnutrición en la vida adulta.

Después de la rehabilitación nutricional balanceada, las ratas malnutridas en la edad temprana mostraron la curva de tolerancia a la glucosa normal a pesar de que presentan disminuída significativamente la producción de insulina. Previamente esto había sido publicado por Hales *et al* 1996, que muestran que con la producción disminuida de insulina, los animales rehabilitados desarrollan estrategias compensatorias que les permiten mostrar la tolerancia a la glucosa normal. Lo anterior se ha atribuido a que los animales expresan mayor número de receptores a insulina en el músculo y por tanto son más sensibles a la hormona. Esto contribuye a mejorar la tolerancia a la glucosa en animales malnutridos y rehabilitados (Ozanne *et al* 1996). Por lo tanto es posible que esta condición se presente en los animales MGL evaluados en este experimento.

Bieswal *et al* 2006, demuestran que a los 8 meses de edad, ratas malnutridas durante las etapas críticas y rehabilitadas al destete, presentaron tanto secreción de insulina como tolerancia a la glucosa similar a los controles. Desai *et al* 1997, muestran que después de 48 horas de ayuno las concentraciones de glucosa e insulina son semejantes a los valores encontrados en sus controles nutricionales. Hales *et al* 1996, demuestran el mismo efecto que reporta Bieswal *et al* 2006, a los 15 meses de edad.

Los datos del presente estudio con los animales malnutridos durante la gestación y la lactancia y rehabilitados hasta el día P180 coinciden con los datos de los experimentos antes mencionados. Esto podría indicar la recuperación del páncreas en los animales malnutridos durante los periodos críticos. En contraste, los animales malnutridos del destete al día P55, mantienen intolerancia a la glucosa, la secreción de insulina y glucagon disminuida que se mantiene aún después de la rehabilitación. Esto podría estar indicando daño pancreático permanente en estos animales.

Las alteraciones en la distribución o en el número de las células alfa y las beta han sido atribuidas principalmente al flujo sanguíneo diferencial que presentan los controles y los animales malnutridos (Berney *et al* 1997 y Snoeck *et al* 1990). En general, poco se ha

estudiado del efecto inmediato de la malnutrición o de la rehabilitación nutricional balanceada en las células α o en la producción de glucagón.

Se pueden encontrar controversias en la literatura en los valores del glucagón por ejemplo, niveles disminuidos en la producción han sido demostrados por [Alvarez et al 1986](#) y [Rao, 1995b](#), mientras que el trabajo de [Ozanne et al 1998](#), muestra que no hay diferencias en la concentración de la hormona.

Es posible que además de alteraciones morfológicas en el páncreas, mecanismos involucrados en la secreción del glucagón, de la insulina o en los receptores de las hormonas, así como en los transportadores de glucosa principalmente en tejido adiposo, músculo e hígado, se vean alterados por la malnutrición al destete. Uno de los mecanismos que pudiera afectar tanto la secreción como la sensibilidad de las hormonas pancreáticas a largo plazo podría ser la elevada secreción tanto de glucocorticoides como de catecolaminas. Esto ya ha sido reportado para ratas malnutridas durante los periodos críticos ([Fagundes et al 2009](#); [Petry et al 2000](#)). Un efecto más intenso podría darse en las ratas malnutridas al destete con efectos a largo plazo.

El tamaño de los lóbulos hepáticos en los animales malnutridos se incrementa en comparación con animales control ([Burns et al 1997](#)). Sin embargo, no hay diferencias si éste se evalúa con respecto al peso corporal de los animales ([Burns et al 1997](#); [Desai et al 1996](#)).

Bajo condiciones *ad libitum* de alimentación [Gosby et al 2003](#), demuestran que el glucógeno hepático se encuentra incrementado, mientras [Gamallo et al 1989](#), mencionan que no existe diferencia entre la concentración de los controles y la de los malnutridos bajo la misma condición metabólica. Después de la rehabilitación nutricional ratas malnutridas durante los periodos críticos tienen concentraciones de glucógeno hepático similares a sus controles nutricionales ([Fagundes et al 2009](#)).

Por otro lado, también se ha encontrado que después de la malnutrición temprana y la rehabilitación nutricional, enzimas que regulan la gluconeogénesis (PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxicinasa) o la glucólisis (GK, glucocinasa) se encuentran aumentadas y disminuidas respectivamente después de 48 horas de ayuno ([Burns et al 1997](#)), lo que se ha relacionado con la alteración en la producción hepática de la glucosa e incremento en el almacenamiento de glucógeno ([Burns et al 1997](#); [Rao, 1995a](#)). En contraste [Rees et al 2006](#), demuestran que ambas enzimas no presentan concentraciones diferentes a sus controles nutricionales cuando estas son evaluadas después de la curva de tolerancia a la glucosa.

En nuestros experimentos no encontramos diferencia significativa en la concentración de glucógeno hepático entre los grupos control y los grupos MGL, MPW o MA; sin embargo, encontramos que los animales MPW rehabilitados en el día P90 presentaron disminución en la concentración del glucógeno hepático.

Es posible que la insulina disminuída observada en este grupo, esté influyendo en la baja concentración de glucógeno, ya que es una señal para que se almacene la glucosa en el hígado. Experimentos *in vitro* como los realizados por [Murphy et al 2003](#), sobre la síntesis y utilización del glucógeno podrían ayudarnos a determinar el mecanismo por el cual las ratas MPL tienen disminución hepática del mismo.

El metabolismo de la glucosa está estrechamente relacionado con el de los lípidos ([Samra, 2000](#)), el cuál también se ve afectado por la malnutrición.

La disminución plasmática de los TAG es efecto directo de la dieta baja en proteína. Esta condición nutricional origina en el hígado déficit para formar las lipoproteínas que liberan los TAG a la circulación, los cuales se acumulan originando estenosis hepática o

hígado graso (Flores *et al* 1970; Ginsberg *et al* 2005). La lipoproteína lipasa, encargada de hidrolizar los TAG en el tejido adiposo y muscular, también se encuentra disminuída como efecto de la malnutrición (Gouache *et al* 1991), y altera por lo tanto los perfiles lipídicos en estos animales.

En el presente trabajo, se encontró que los grupos MGL y MPW, presentan valores disminuidos de TAG en contraste con las ratas MA que tienen los mismos niveles que sus controles nutricionales. Es posible que en los dos primeros casos exista acumulación de TAG en el hígado.

Ratas malnutridas durante la gestación y la lactancia, después de la rehabilitación nutricional a los 90 días de vida bajo condiciones *ad libitum* de alimentación, presentan concentración disminuída de TAG y altos niveles de AGL. Después de 24 horas de ayuno no muestran diferencias significativas (Ozanne *et al* 1998).

En un trabajo previo en nuestro laboratorio demostramos, que ratas rehabilitadas a los 90 días de edad, tenían valores de TAG y AGL similares a sus controles nutricionales bajo las condiciones metabólicas de *ad libitum*, ayuno de 48 horas y saciedad (Miñana-Solis & Escobar 2006).

En el presente trabajo se encontró que después de la rehabilitación nutricional balanceada las ratas MGL aparentemente pueden regular su lipidemia, mientras que las ratas MPW tanto al día P90 como al día P180 presentan dislipidemia (valores elevados de TAG y disminuidos de AGL).

El aumento en la concentración de TAG plasmáticos puede deberse (a diferencia del estado de malnutrición) a la excesiva formación y liberación en el hígado y/ o en el tejido adiposo. Sin embargo, habría que explorar cómo se lleva a cabo este cambio en la regulación lipídica después de la rehabilitación nutricional.

La concentración significativamente disminuida de AGL puede deberse a la elevada oxidación en el hígado y/ o en el músculo, resistencia hepática a la insulina o la secreción hormonal disminuída por el páncreas, la cual se observó en estos animales.

La evaluación de las lipoproteínas de alta, baja y muy baja densidad así como el colesterol y las enzimas relacionadas con la lipólisis tanto en el tejido adiposo, como en el músculo y en el hígado de los animales malnutridos y rehabilitados es de gran relevancia ya que estas alteraciones metabólicas están relacionadas con alteraciones cardiovasculares (Ginsberg & Illingworth, 2001), las cuales a la vez se han correlacionado con la malnutrición temprana.

Las discrepancias entre los datos obtenidos en el presente estudio y en la bibliografía citada, es probable que se deban:

- A la condición metabólica, la hora del día en la cual se toman las muestras de los animales, la edad en la cual se evalúan, así como la especie y cepa utilizada.
- Los diferentes modelos de deficiencia nutricional utilizados (desnutrición o malnutrición) por otros grupos de estudio, las diferentes etapas y/ o a la duración de la deficiencia nutricional y de la rehabilitación nutricional, es otra importante variable que tiene que ser tomada en cuenta cuando se comparan los modelos.

No obstante el modelo utilizado, las conclusiones a las que se llega en cada uno, es que la deficiencia nutricional conlleva a alteraciones metabólicas que perduran a largo plazo. Sin embargo, considero que es de suma importancia evaluar los mecanismos mediante los cuales se desencadenan estas alteraciones en los diferentes modelos.

Por tratarse de especies diferentes (i.e. humanos, roedores, etc.), al compara los resultados obtenidos en los modelos de laboratorio, se corre el riesgo de que no todo se pueda extrapolar. El analizar y comparar los efectos que se observan en cada modelo,

podría darnos una visión más amplia de los posibles efectos que se podrían observar en los humanos y la posible explicación a los hallazgos en los estudios epidemiológicos.

Es importante hacer notar en esta parte de la discusión, que en contraste con los grupos MGL y MPW, las ratas MA no mostraron diferencias con respecto a sus controles en los parámetros metabólicos evaluados. Es posible que un mes de la deficiencia nutricional en la etapa adulta no sea suficiente para originar alguna alteración sin embargo, un periodo mayor de tiempo podría modificar el metabolismo.

Las diferencias de los parámetros metabólicos evaluados, se encontraron en los grupos MGL y MPW así como en los grupos rehabilitados correspondientes, es por ello que se decidió solo abarcar estos grupos para los experimentos posteriores.

La malnutrición en etapas tempranas del desarrollo induce que el peso neto del cerebro sea inferior en comparación con el de animales alimentados con dieta balanceada. Sin embargo, si se evalúa con respecto al peso corporal del animal, éste pesa proporcionalmente más que el de los controles nutricionales. Lo anterior ha originado que se considere como órgano protegido a expensas de otros como el hígado o el páncreas que presentan proporcionalmente menor peso ([Resnick et al 1982](#)).

[Morgane et al 1993](#), mostraron que existe retraso en la proliferación celular y alteraciones en el proceso de migración neuronal en ratas malnutridas. A nivel de hipocampo se encontró que animales malnutridos presentan disminución celular, relacionada con el déficit de atención, aprendizaje y memoria que se ha descrito para estos animales. Estos efectos se revierten con la dieta balanceada a los 90 días de edad ([Díaz-Cintra et al 2007](#)).

En el hipotálamo, la malnutrición durante las etapas tempranas de desarrollo induce que en el NSQ la densidad y el tamaño neuronal se vean disminuidos, lo que da origen a alteraciones en el patrón de sueño y de conducta ([Aguilar-Roblero et al 1997](#); [Cintra et al 1994](#)). [Plagemann et al 2000a](#) demostraron que en ratas malnutridas, el volumen celular total de los núcleos PVN y VMH se encuentra aumentado en comparación con animales alimentados con dieta balanceada.

En el hipotálamo se lleva a cabo, en coordinación con los órganos periféricos, la homeostasis metabólica. Sin embargo, pocos estudios se han enfocado a estudiar los efectos que la malnutrición podría tener en esta área del cerebro. Particularmente en los núcleos ARC, DMH, PVN, VMH y el LH, ya que estos están estrechamente relacionados con la ingesta de alimento y el balance energético ([López et al 2007](#); [Lynch et al 2000](#); [Marty et al 2007](#)) (**Figura 3**).

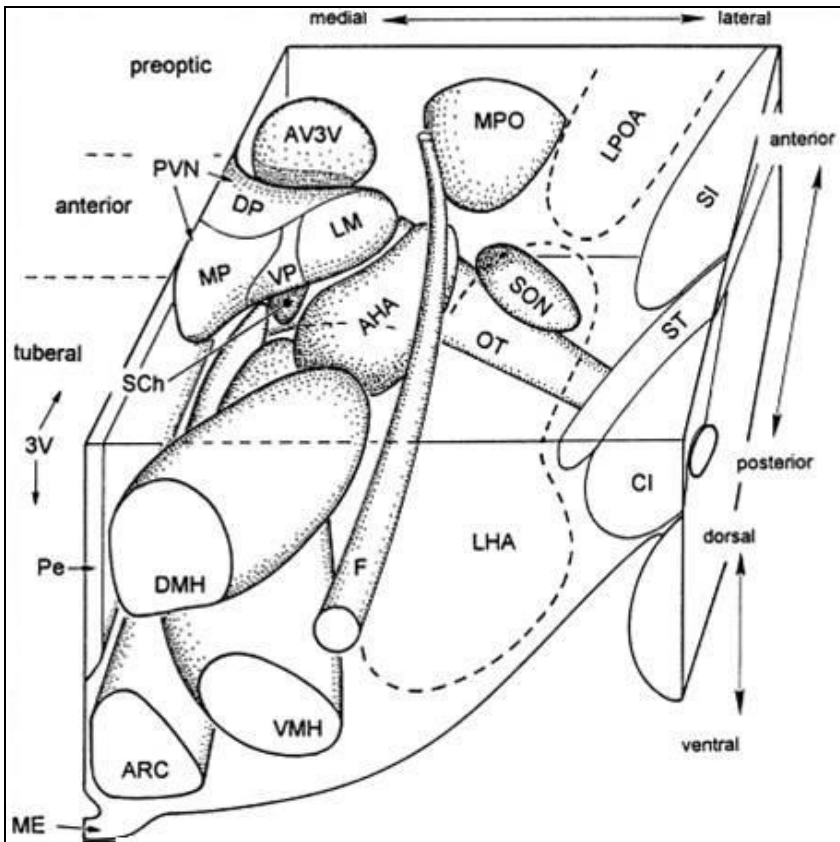


Figura 3: Esquema tridimensional del hipotálamo de rata. Vista dorsocaudal del hemisferio derecho. Abreviaturas: **AHA**, área hipotalámica anterior; **ARC**, núcleo arqueado; **AV3V**, área anteroventral del tercer ventrículo; **CI**, cápsula interna; **DP**, subnúcleo parvocelular dorsal del núcleo paraventricular (**PVN**); **DMH**, núcleo dorsomedial; **F**, fórnix; **LHA**, área hipotalámica lateral; **LPOA**, área preóptica lateral; **ME**, eminencia media; **MP**, subnúcleo parvocelular medial del núcleo paraventricular; **MPO**, área preóptica medial; **OT**, tracto óptico; **Pe**, periventriculo; **Sch**, núcleo supraquiasmático; **SOP**, núcleo supraóptico; **SI**, sustancia *inominata*; **ST**, núcleo subtalámico; **VMH**, núcleo ventromedial; **VP**, subnúcleo parvocelular ventral del núcleo paraventricular. (Tomado de [Berthoud, 2002](#)).

Para evaluar la actividad en el cerebro se han utilizado el ARNm o la expresión de la proteína c-Fos como indicador indirecto de actividad neuronal, bajo distintas condiciones metabólicas (Darcel *et al* 2005; Dunn-Meynell *et al* 1997; Riediger *et al* 2004).

C-Fos es un protooncogen que pertenece a la familia de genes de expresión inmediata de factores de transcripción. La proteína y el ARNm de c-Fos se expresan en las células del sistema nervioso central de manera constitutiva. Sin embargo, estímulos químicos, fisiológicos o eléctricos, pueden estimular su sobreexpresión. Algunos estímulos que inducen su expresión son los factores de crecimiento y los cambios de potencial de la membrana celular, así como la concentración de iones como el calcio.

La activación de la transcripción de c-Fos comienza 5 minutos después del estímulo y alcanza el máximo de expresión después de 30-45 minutos. La síntesis de la proteína sigue a la expresión del ARNm y tiene su punto máximo a los 90 minutos después del estímulo (Morgan & Curran, 1991).

En el presente estudio evaluamos la actividad neuronal mediante la cuantificación del número de células inmunoreactivas a la proteína de c-Fos en ratas malnutridas y rehabilitadas después del BIP de glucosa. Encontramos que los efectos de la malnutrición en el hipotálamo fueron selectivos. Actividad neuronal diferencial fue observada en el ARC, PVN y el VMH. En contraste, el DMH y el área PF no mostraron alteraciones debidas a la malnutrición temprana o del destete al día P55.

El aumento en el número de células IR-cFos observada en el VMH de las ratas MGL dos horas después del BIP de glucosa se revirtió con la rehabilitación balanceada. Plagemann *et al* 2000a, muestran que el número de células en este núcleo se encuentra aumentado en animales malnutridos. Es posible que el incremento en la IR- que nosotros observamos se deba a este incremento celular y que al destete se reorganice el núcleo. Es decir, que durante la lactancia el hipotálamo se encuentre aún inmaduro y al alimentar a los animales con la dieta balanceada al destete, el hipotálamo se reorganice anatómicamente.

Las ratas MPW durante el periodo de malnutrición presentaron mayor número neuronal IR-cFos en el VMH. Después de la rehabilitación nutricional la actividad disminuyó. Es posible que la malnutrición influya en la etapa del destete para la reorganización y ajuste del hipotálamo a la dieta sólida, alterando su fisiología. Por otro lado también cabe la posibilidad de que el incremento en la IR, sea el resultado de la concentración elevada de glucosa que encontramos dos horas después de la curva de tolerancia en los dos grupos malnutridos.

Dunn-Meynell *et al* 1997, demuestran que el VMH aumenta su actividad en respuesta al bolo de glucosa. Con estudios electrofisiológicos Silver & Erecińska 1998, demostraron que este núcleo responde de manera dosis dependiente a las concentraciones de glucosa. Con lo cual es posible que el incremento en el número neuronal IR-cFos encontrado tanto en el grupo MGL como en el MPW en el VMH se deba a la concentración elevada de glucosa obtenida en las ratas.

El ARC está en contacto directo con la eminencia media, que es considerada como órgano circunventricular. Este núcleo recibe la información directa de las señales periféricas tanto metabólicas como hormonales (Norsted *et al* 2008). Por otra parte, las neuronas del PVN tienen contacto con el tercer ventrículo (Norsted *et al* 2008) y además el ARC y el PVN, tienen interconexión neuronal. La actividad entonces del PVN, considerado como núcleo integrador (Williams *et al* 2001), se ve influenciada por

las terminales axónicas de otros núcleos como el ARC y es posible que la respuesta a señales periféricas o centrales en estos dos núcleos se altere recíprocamente.

En el ARC se ha descrito que la actividad neuronal, evaluada mediante la expresión de c-Fos, se incrementa cuando los animales se someten al ayuno, mientras la infusión de glucosa o realimentación revierte esta respuesta (Becskei *et al* 2008). En contraste en el PVN la respuesta es inversa al ARC es decir, después del bolo intracarotídeo de glucosa se induce el incremento de la actividad de las células (Dunn-Meynell *et al* 1997 y Guillod-Maximin *et al* 2004), y ésta disminuye bajo la condición de euglucemia o hipoglucemia (Ao *et al* 2005).

El grupo MGL presentó en general la respuesta esperada y semejante a sus controles en los núcleos ARC y PVN después del bolo de glucosa. En contraste, las ratas MPW mostraron respuestas contrarias a las descritas en la literatura en ambos núcleos. Un factor que pudiera afectar la detección de glucosa en estos núcleos es la barrera hematoencefálica (BHE). Esto es debido a la interacción con el 3er ventrículo del ARC y PVN.

Es posible que la BHE se vea alterada con la malnutrición ya que del destete a los 35 días, ésta modifica su permeabilidad y por tanto el paso de glucosa a los órganos ciconventriculares (i.e. la eminencia media) y también el paso de moléculas a núcleos como el PVN. Se considera que la BHE está totalmente madura y con ello es más selectiva al paso de moléculas hasta los 60 días de edad en la rata (Nehlig, 1997).

La hiperglucemia que se observó en las ratas MPW al final del BIP de glucosa a los 55 días posnatales, pudo alterar la permeabilidad de la BHE. Simpson *et al* 1999 demuestran que niveles extremadamente altos o bajos de glucosa modifican su permeabilidad. Esto podría entonces dar como resultado alteraciones en la respuesta neuronal en el ARC y PVN en las ratas malnutridas a partir del destete, en respuesta a la hiperglucemia observada.

Por otro lado, diversas señales periféricas como la leptina (Delahaye *et al* 2008; Vickers *et al* 2005), la insulina (Plagemann *et al* 1999), y los glucocorticoides (Kehoe *et al* 2001), juegan un papel importante durante el desarrollo en la organización anatómica y funcional del hipotálamo.

Es posible que en los animales MPW la insulina disminuida que se reportó, en el experimento 1, y probablemente la leptina y los glucocorticoides estén también modificados y participando en la remodelación y maduración hipotalámica en estos animales. Sin embargo, estudios ontogenéticos y de madurez hipotalámica son necesarios para integrar la influencia de señales periféricas alteradas y las adecuaciones y respuestas de estos núcleos a la malnutrición tardía.

Después de la rehabilitación nutricional las ratas MPW-R mostraron disminución en el número de neuronas IR-cFos en los núcleos ARC, PVN y VMH, en respuesta a las concentraciones normales de glucosa observadas en estos animales en comparación con sus controles nutricionales. Modificaciones en la sensibilidad o en la respuesta a la glucosa así como también en la permeabilidad alterada de la BHE durante el periodo de malnutrición, podrían ser una posible explicación a la respuesta disminuida que se observa en los núcleos.

Las neuronas y las células β pancreáticas detectan la concentración de glucosa de forma similar. Esta se lleva a cabo por medio de la Glucocinasa (GK) y los transportadores de glucosa, especialmente GLUT1 y GLUT3 (Mountjoy & Rutter, 2007). El ARNm de GLUT3 se encuentra ampliamente distribuido en las neuronas en el ARC, PVN y VMH (Lynch *et al* 2000) mientras que GLUT1 en la BHE (Vannucci *et al* 1998).

Se ha demostrado que en animales malnutridos los transportadores de glucosa en cerebro se encuentran alterados [Sadiq et al 1999](#). También en el páncreas y en el hígado se ha descrito la disminución de la GK en estos animales ([Desai et al 1997](#); [Hales et al 1996](#)). Con estos estudios podemos suponer que la detección hipotalámica de glucosa en los animales MPW-R se encuentra alterada permanentemente y la respuesta celular, a pesar de la rehabilitación nutricional y de concentraciones normales de glucosa, no es la adecuada.

El peso corporal así como el porcentaje de incremento del mismo en los grupos MGL y MPW, fue inferior al de sus respectivos grupos control durante los periodos de malnutrición.

El National Research Council (1995), reporta que el mínimo de proteína para la subsistencia de las ratas es de 5% mientras que para que se lleve a cabo el correcto crecimiento e incremento de peso es del 15% ([Elverdin et al 2006](#)). Esto explica los resultados obtenidos en el presente estudio. A pesar de que la dieta 6% de proteína es isocalórica, la deficiencia de proteína induce que los animales no logren el peso adecuado para la edad y la talla esperada, de tal manera que su porcentaje de incremento también es inferior al de sus controles nutricionales.

Durante el periodo de rehabilitación nutricional, los grupos MGL-R y MPW-R, mantienen su peso corporal por debajo del grupo control. En contraste, el porcentaje de incremento de peso durante este periodo, es mayor en ambos grupos.

[Desai et al 1996](#) y [Resnick et al 1982](#), consideran que debido a que los animales no logran alcanzar el peso de sus controles, estos no se rehabilitan. Lo anterior pone de manifiesto que es importante tomar en cuenta la perspectiva desde la cual se analiza la rehabilitación nutricional.

El mayor porcentaje de incremento en los grupos MGL-R y MPW-R durante el periodo de rehabilitación podría deberse a que las ratas presentan hiperfagia. La cual es evidente al evaluar la ingesta de alimento respecto al peso corporal de los animales. Esta condición no se observa si tomamos el peso neto de la cantidad de alimento que ingieren. Algunos estudios proponen que estos animales presentan obesidad “enmascarada”, la cual se manifiesta sólo cuando son expuestos a dietas excesivas ([Bieswal et al 2006](#); [Desai et al 1997](#)). El efecto de esta nueva condición nutricional se le conoce como “fenotipo frugal o económico” ([Hales & Barker 1992](#); [Petry, 2001](#)).

La mayor proporción del peso de los tejidos adiposos: abdominal, retroperitoneal y gonádico podría ser la causa del incremento de peso corporal que se observa en las ratas rehabilitadas. [Dollet et al 1985](#); [Gosby et al 2003](#), demuestran que el tejido adiposo en animales rehabilitados, pesa menos que en animales control. [Orozco-Sólis et al 2009](#); [Thompson et al 2007](#), muestran que en animales rehabilitados estos tejidos pesan más que en los animales control al evaluarlos con respecto a sus pesos corporales.

El incremento en la proporción del peso de los paquetes adiposos puede deberse al número elevado de receptores de insulina y al incremento en la toma de glucosa que ha sido demostrado en estos animales ([Remacle et al 2004](#)). Esto promueve la acumulación de grasa y por tanto la obesidad.

En resumen, el incremento en la proporción de peso corporal durante el periodo de rehabilitación, se puede deber a la hiperfagia y al incremento de grasa que se observa en las ratas MGL-R y MPW-R.

En el hipotálamo medial, se producen neuropéptidos asociados a los estados metabólicos de hambre y saciedad, conocidos como orexigénicos y anorexigénicos,

respectivamente (Leibowitz & Wortley 2004; López *et al* 2007). La producción de estos, depende de señales periféricas como la glucosa, ácidos grasos, insulina, glucagon, leptina, etc. Estas provienen de órganos como el hígado, tejido adiposo y páncreas (Marty *et al* 2007). Las señales metabólicas y hormonales, junto con las producidas en el hipotálamo, regulan el peso corporal, la ingesta de alimento, el gasto y la acumulación energética (Williams *et al* 2001) (Figura 4).

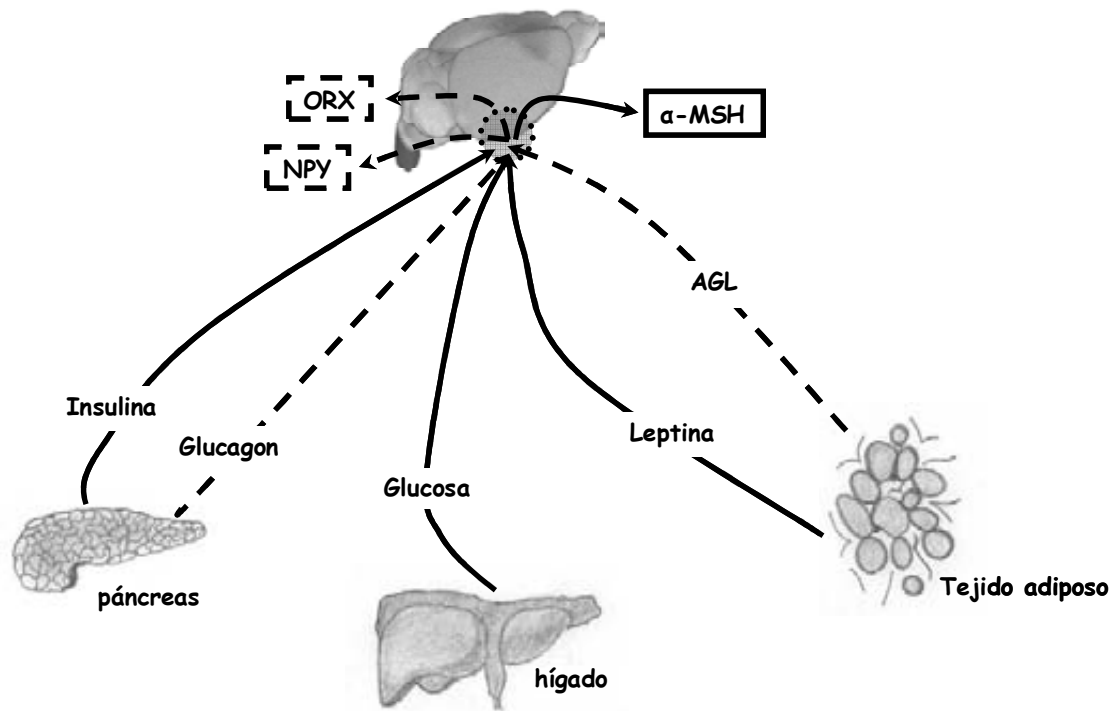


Figura 4: Esquema que representa algunas de las señales metabólicas que se producen bajo los estados metabólicos, orexigénico (- -) y anorexigénico (—). Las señales periféricas (glucosa, ácidos grasos libres, insulina, glucagon y leptina), llegan al hipotálamo ventral, en dónde son integradas por los núcleos relaciondos con el balance energético y la ingesta de alimento. En ellos se producen los neuropéptidos que estimulan (NPY u ORX) o inhiben la ingesta de alimento (α -MSH).

Dentro de los péptidos orexigénicos se ubican a las orexinas (ORX) y el neuropéptido Y (NPY). Las ORX se sintetizan básicamente en células del LH, las cuales proyectan principalmente al ARC y VMH (Sakurai, 2006). El NPY se sintetiza en el ARC, cuyas células proyectan hacia el PVN, DMH, VHM y LH (Jolicœur *et al* 1995).

El α -MSH es un neuropéptido anorexigénico que se sintetiza a partir de las proopiomelanocortinas. Se produce en células del ARC que proyectan hacia el LH, PVN y DMH (Cone, 2005).

El NPY y las ORX son neuropéptidos que incrementan su concentración cuando disminuyen los niveles de glucosa y en general bajo el estado catabólico. El α -MSH por el contrario, es un péptido que se produce cuando existen niveles elevados de glucosa o después de la alimentación (estado anabólico).

Dos horas después del BIP de glucosa la expresión de ORX en el LH tanto en los grupos malnutridos como en los rehabilitados fue similar a sus controles nutricionales.

Es posible que la malnutrición no altere la expresión de las ORX, como se vió en este estudio y como ha sido demostrado por Remmers *et al* 2008. Al parecer, solo con la dieta alta en grasas durante el periodo perinatal, se induce incremento de la expresión de ORX en el LH (Chang *et al* 2008).

Se ha demostrado que la expresión de las ORX en el LH se modifica dependiendo de las concentraciones de glucosa (Bernardis & Bellinger 1996; Orsini *et al* 1992). Alternativamente, las ratas malnutridas presentaron hiperglucemia, y la expresión de ORX fue similar a sus respectivos controles. Se esperaba la disminución de la expresión de este neuropéptido, como efecto de los elevados niveles de glucosa, como ha sido demostrado por Cai *et al* 1999. Sin embargo, en las ratas malnutridas las células del LH no están respondiendo correctamente, a los niveles elevados de glucosa y por tanto su actividad pudiera estar alterada debido a la malnutrición.

La IR- de los péptidos NPY y α -MSH se ve alterada de manera diferencial tanto por la malnutrición como por la rehabilitación nutricional. En las ratas MGL se observó la expresión de la IR-NPY elevada en el núcleo ARC y PVN. En contraste, las ratas MPW no mostraron ninguna diferencia en la expresión de NPY con respecto a sus controles nutricionales. Ambos grupos malnutridos mostraron disminuída la IR- α -MSH en el PVN y DMH. También el grupo MPW mostró disminuido el número de neuronas que expresa α -MSH en el ARC.

Se esperaba que la respuesta en ambos grupos malnutridos fuera: la disminución en la IR-NPY y el aumento en IR- α -MSH como resultado de los altos niveles de glucosa encontrados. Debido a que el incremento en la concentración de glucosa es una señal de saciedad (Arora & Anubhuti, 2006).

Como se describió anteriormente, señales periféricas como la insulina y la leptina, durante la vida temprana, influyen de manera decisiva en el correcto desarrollo del hipotálamo, y principalmente de las vías relacionadas con el balance energético. (Delahaye *et al* 2008; Grove & Smith 2003; Vickers *et al* 2005).

Es posible que los bajos niveles de insulina encontrados en el experimento 1, en las ratas malnutridas, influyeran en el correcto desarrollo de ambos sistemas contraregulatorios. Además, también es posible que los efectos diferenciales debidos a los dos diferentes periodos de malnutrición, se deban a la distinta vulnerabilidad en ambos sistemas (orexigénico y anorexigénicos). La expresión de α -MSH disminuída puede correlacionarse con el estado energético negativo de los animales malnutridos. En los cuales, la señal de saciedad no se activa correctamente.

A los 90 días de edad, con niveles normales de glucosa dos horas después del BIP, el grupo MGL-R no presentó ninguna diferencia en la expresión de NPY, mientras el grupo MPW-R presentó incremento en la IR- en el DMH. En contraste, ambos grupos rehabilitados mostraron disminuida la IR- α MSH en el PVN.

La interpretación de la desregulación hipotalámica en las ratas rehabilitadas es compleja.

[Yang et al 2009](#), demostraron que la alteración de la expresión de NPY en el DMH en las ratas, es factor importante que puede modificar la ingesta de alimento, originando desbalance energético y finalmente obesidad.

Es posible que el incremento en la IR- de NPY en el DMH en las ratas de este experimento, esté relacionado con la propensión a desarrollar obesidad (u obesidad enmascarada). Lo cual ha sido descrito por [Bi et al 2001](#) y [2003](#), en modelos genéticos de obesidad.

Por otro lado, el circuito α -MSH-ARC-PVN es fundamental en la transmisión de la señal de saciedad ([Millington, 2007](#)). La baja IR- α -MSH en las ratas rehabilitadas, es posible que sea efecto de la disminución en las proyecciones ARC-PVN. Por lo tanto la expresión disminuída del neuropéptido en el PVN podría estar relacionada con el desequilibrio en el sistema de retroalimentación hambre/saciedad que origina patrones alterados de alimentación ([Karla et al 1999](#)). Esto correlacionaría con el incremento en proporción del peso corporal, de la ingesta de alimento y del incremento en el peso del tejido adiposo que presentaron ambos grupos (MGL-R y MPW-R) durante el periodo de rehabilitación nutricional.

El desarrollo de la obesidad, la diabetes, patologías cardiovasculares o el síndrome metabólico es un proceso multifactorial que clásicamente, se ha asociado a efectos permanentes debidos a la nutrición deficiente. La desnutrición o malnutrición durante la vida temprana origina la “programación metabólica”, cuyos efectos perduran hasta la vida adulta. [Lucas A. 1998](#), define a la ventana crítica, como el periodo durante el desarrollo en el cual se llevan a cabo importantes cambios estructurales y funcionales de los órganos y sistemas. Si el individuo es expuesto a condiciones ambientales adversas, estas pueden originar consecuencias a largo plazo es decir, la “programación metabólica”.

Bajo la definición clásica de “periodo crítico” y “programación metabólica”, se han estudiado los efectos que produce la malnutrición durante la gestación y la lactancia. Sin embargo, muy pocos estudios se han enfocado a estudiar los efectos de la malnutrición después de los “periodos críticos”. Este trabajo plantea posibilidad de la extensión de estos periodos o el establecimiento de etapas vulnerables durante la vida de la rata (del dente a la pubertad), para el estudio de los efectos de la malnutrición en la homeostasis metabólica.

A lo largo de este estudio se hizo referencia a distintas citas bibliográfica, en las que se menciona que *per se* la dieta desbalanceada o en exceso puede originar alteraciones a largo plazo independientemente de las influencias genéticas o ambientales durante la vida temprana.

Así mismo también se encontraron varios estudios que al compararlos daban como resultado diversas controversias entre los resultados encontrados en cada uno. Por ello, al comparar los resultados obtenidos en cada estudio debe de tomarse en cuenta todas las variables que podrían estar afectando la interpretación de los resultados y la determinación de sus efectos.

Los modelos en animales bajo condiciones controladas de laboratorio han permitido explorar las diferentes patologías así como los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que las componen. Estos modelos no pueden ser usados como sustitutos en los estudios de patologías como la diabetes y la obesidad en los humanos. Estos permiten explorar los aspectos que éticamente no pueden ser estudiados en el ser humano. Todos los modelos explorados proveen información de cómo se lleva a cabo el proceso de la “programación” y a que nivel podría estar actuando. Sin embargo, la interpretación de los datos y la extrapolación debe de realizarse con cautela.

9. CONCLUSIONES GENERALES

- ◆ La malnutrición en cualquier etapa de la vida, indujo bajo peso corporal. Del destete a los 55 días al igual que durante los periodos críticos, la malnutrición produjo retraso en el crecimiento que se reflejó en el bajo peso permanente en las ratas. La malnutrición en la edad adulta indujo la pérdida de peso corporal que se recuperó con la rehabilitación nutricional balanceada.
- ◆ La malnutrición durante la gestación y la lactancia indujo hiperglucemia y niveles disminuídos de triacilgliceroles. La malnutrición del destete hasta el día posnatal 55, modificó los valores de regulación metabólica de la glucosa, ácidos grasos libres triacilgliceroles, insulina y glucagon. En la edad adulta la deficiencia nutricional no indujo ninguna alteración en los valores de regulación metabólica.
- ◆ Los efectos de la malnutrición en el periodo crítico del desarrollo sobre el metabolismo de la glucosa y los lípidos se revirtió con la rehabilitación nutricional balanceada, mientras que la malnutrición posterior al destete tuvo efectos permanentes en el metabolismo de la glucosa, lípidos y en la producción de hormonas pancreáticas.
- ◆ La malnutrición temprana modifica selectivamente la actividad neuronal en núcleos hipotalámicos relacionados con el balance energético. Los núcleos ARC, PVN y VMH mostraron la expresión diferencial, mientras que el DMH y el área perifornical no parecen ser afectados por la malnutrición.
- ◆ Los efectos deletéreos de la malnutrición temprana sobre la respuesta neuronal hipotalámica, se revirtieron con la rehabilitación nutricional balanceada, mientras que los efectos de la malnutrición al destete fueron permanentes.
- ◆ La expresión del NPY en ratas malnutridas en la edad temprana se vio incrementada en el ARC y PVN. La malnutrición temprana y tardía induce la reducción de la expresión de α -MSH en el ARC, PVN y DMH.
- ◆ La rehabilitación nutricional revierte los efectos de la malnutrición temprana en la expresión de NPY. Mientras la expresión de α -MSH se ve permanentemente disminuída en ratas previamente malnutridas temprana y tardíamente.
- ◆ **Esta tesis puso en evidencia que la malnutrición después del destete tiene efectos deletéreos y permanentes sobre el metabolismo periférico y el funcionamiento de núcleos hipotalámicos involucrados en el balance energético. Estos podrían originar a largo plazo obesidad. Por lo tanto plantea la necesidad de ampliar el concepto de periodos críticos del desarrollo a etapas tardías posteriores a la lactancia para el estudio de los efectos deletéreos y permanentes de la malnutrición.**

10. ANEXO:

“EFECTOS DIFERENCIALES DE UN PROTOCOLO DE RESTRICCIÓN DE ALIMENTO EN LA EXPRESIÓN DE GENES RELOJ EN EL HIPOTÁLAMO DE LA RATA”

Durante el desarrollo de este proyecto de doctorado además de llevar a cabo los experimentos relacionados con la malnutrición y la rehabilitación nutricional, me involucré con el tema de los ritmos biológicos y realicé dos estancias de investigación en el “Institut de Neurosciences Cellulaires et Intégratives” en el Département de Neurobiologie des Rythmes, de la Université de Strasbourg, en Estrasburgo, Francia. Bajo la dirección del Dr. Paul Pévet y el Dr. Etienne Challet. Durante las estancias tuve la oportunidad de colaborar en el proyecto M04-S02 del programa ECOS-Nord / Anuies titulado “Identificación y caracterización molecular del reloj sincronizado por alimento” del cual se originó la siguiente publicación.

El objetivo principal de este artículo fue caracterizar las oscilaciones de genes reloj en el hipotálamo bajo la influencia de la sincronización por alimento. La expresión de genes reloj se valuó en núcleos hipotalámicos involucrados en la regulación circadiana de la ingesta de alimento: NSQ, ARC, DMH, PVN y VMH.

En este artículo se publicaron resultados novedosos como el hecho de que la sincronización por alimento induce el cambio de fase diferencial en la expresión de los genes reloj: *Per1*, *Per2* y *Bmall*, evaluados mediante la concentración del ARNm. Encontramos también que el NSQ puede también ser modificado por el alimento bajo condiciones especiales como en este caso la restricción de alimento o dieta hipocalórica ([Mendoza et al 2005](#)). Este núcleo comúnmente se conoce como el reloj maestro en los mamíferos y está sincronizado u obedece particularmente las señales temporales del ciclo luz-obscuridad, las cuales transmite al resto del organismo.

A la vez se observó que *Per1* se sincroniza en el ARC y el DMH. Estas son estructuras que anticipan es decir, se “preparan” y “estiman” el tiempo en el cual se va a presentar el alimento. En estos mismos núcleos observamos que se induce la disminución del RNAm de *Per2* después de la llegada del alimento, lo que contrasta con estudios previos ([Verwey et al 2007](#)).

Se describió que el alimento induce aumento en la expresión de *Per1* y *Per2* en el PVN, que coincide con estudios previos que demuestran expresión incrementada del ARNm y la proteína de c-Fos ([Ángeles-Castellanos et al 2004](#); [Poulin & Timofeeva, 2008](#)).

El ARNm de *Bmall*, prácticamente no mostró ningún cambio asociado a la restricción de alimento en los núcleos hipotalámicos evaluados.

Este trabajo contribuye a los ya más de 30 años que se han dedicado diversas investigaciones a encontrar la estructura o en su defecto la red de estructuras (que es lo que yo creo que existe) que forman parte de lo que en ritmos biológicos se conoce como el FEO (por sus siglas en inglés) de Food-entrained-oscillator o el oscilador-sincronizado por el alimento (OSA, por sus siglas en español). Este se encarga de estimar el tiempo de la llegada del alimento, y se podría localizar ya sea dentro del sistema nervioso central o en órganos periféricos (o ambos). Así mismo también cabe mencionar que diversos estudios se han dedicado a analizar las señales periféricas como la insulina, el glucagon y la corticoesterona que podrían formar parte de este sistema “medidor o estimador del tiempo” ([Díaz-Muñoz M et al 2000](#)).

En resumen este estudio apoya la teoría de que el alimento es una señal muy importante para los organismos y su supervivencia, además de que este influye de manera fundamental en la organización de los ritmos circadianos a nivel del hipotálamo para llevar a cabo el balance energético y el estado de alertamiento.

“Differential effects of a restricted feeding schedule on clock-gene expression in the hypothalamus of the rat”.

Miñana-Solis MC, Angeles-Castellanos M, Feillet C, Pévet P, Challet E and Escobar C.
Chronobiol Int. 26(5): 808-820.

ABSTRACT

Restricted feeding schedules (RFS) entrain digestive, hormonal and metabolic functions as well as oscillations of clock genes such as *Per1* and *Per2* in peripheral organs. In the brain, in particular in the hypothalamus, RFS induce and shift daily rhythms of *Per1* and *Per2* expression. To determine whether RFS affect clock genes in extra- SCN oscillators in a uniform manner, the present study investigated daily rhythms of *Per1*, *Per2* and *Bmal1* expression in various hypothalamic regions. Wistar rats were entrained to daily RFS (2 h food access starting at ZT6, 6 h after lights on) (RF) or fed *ad libitum* (C) for 3 weeks. Brains were sampled every 3 h starting at ZT0, and hypothalamic slices were processed with *in situ* hybridization. In response to RFS, *Per1* expression showed a 3 h phase-advance in the suprachiasmatic nuclei (SCN), while it was triggered at ZT6, anticipating food access in both arcuate (ARC) and dorsomedial nuclei (DMH). It was unaffected in the ventromedial (VMH) and paraventricular (PVN) nuclei. In contrast, *Per2* expression during RFS showed a marked post-prandial peak in the PVN, was unchanged in the SCN and ARC, and was down-regulated in the DMH and VMH. The temporal patterns of *Bmal1* expression was not significantly modified in RF rats. Because RFS differentially affected clock gene expression (phase-change, up- or down-regulation) depending on the combination of hypothalamic nuclei and targeted genes, the present data clearly highlight the fact that metabolic or temporal cues elicited by feeding have profound effects on temporal organization in the brain.

KEYWORDS: Circadian rhythms, *Per1*, *Per2*, *Bmal1*, suprachiasmatic nucleus

INTRODUCTION

In mammals, the master biological clock is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN), which is mainly synchronized by the light: dark signals. Self-sustained circadian rhythmicity, such as that generated in the SCN, is thought to rely on interlocking transcriptional/ translational feedback loops that involve several clock genes and proteins, including *Bmal1*, *Clock*, *Per1* and *Per2* (Okamura et al., 2002).

In nature, food is seldom available along the 24 h. Therefore animals need to know where and when foraging to find food. It is suggested that a food entrained oscillator provides time cues to predict, anticipate and respond to feeding opportunities (Stephan, 2002). The underlying mechanisms providing food related timing cues are still poorly understood.

Experimental models have been developed to better uncover the mechanisms of the food-driven oscillator. When access to food is restricted to a few hours daily during the light phase, rodents develop arousal and increased locomotor activity anticipating meal time (Mistlberger, 1994; Stephan, 2002), overriding the signals coming from the SCN which remains coupled to the light–dark cycle (Stephan, 1992). Moreover such restricted feeding schedules (RFS) entrain digestive, hormonal and metabolic functions (Davidson & Stephan, 1999; Díaz-Muñoz et al., 2000; Escobar et al., 1998; Honma et al., 1983; Krieger et al., 1977). It entrains also *Per1* and *Per2* oscillations in peripheral organs,

uncoupling their daily oscillations from the SCN (Damiola et al., 2000; Hara et al., 2001; Stokkan et al., 2001; Wakamatsu et al., 2001; Yamazaki et al., 2000).

It is also known that in the brain of rats exposed to RFS, daily patterns of c-FOS expression are elicited or phase-changed in hypothalamic and brain stem regions involved in mediating metabolic and arousal signals to the rest of the brain (Ángeles-Castellanos et al., 2004; Ángeles-Castellanos et al., 2005; Gooley et al., 2006; Meynard et al., 2005). Also corticolimbic structures involved in hedonic and motivational processes exhibit food-entrained patterns in c-FOS expression (Ángeles-Castellanos et al., 2007; Mendoza et al., 2005a).

In the dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DMH), the arcuate nucleus (ARC) and perifornical area (PeF), all hypothalamic areas involved in energy balance and feeding behaviour, RFS induce or increase the amplitude of daily rhythms of *Per1* and *Per2* genes or their proteins (Ángeles-Castellanos et al., 2008; Mieda et al., 2006; Verwey et al., 2007), suggesting oscillatory mechanisms in these structures. Areas of the corticolimbic system also exhibit daily rhythms of *Per1* and *Per2* genes and their proteins adjusted to a scheduled meal time (Ángeles-Castellanos et al., 2007; Ángeles-Castellanos et al., 2008; Verwey et al., 2007; Verwey et al., 2008; Waddington-Lamont et al., 2007; Wakamatsu et al., 2001), suggesting that RFS can drive daily rhythms of clock genes and proteins in the extra- SCN oscillators involved in energy homeostasis and motivation for food.

It is not clear however, whether clock genes in extra- SCN oscillators respond to feeding schedules in a uniform manner and whether this regulation is structure specific. Our recent study rather supports the last interpretation (Feillet et al., 2008). The proteins PER1 and PER2 are not identically phased in hypothalamic and other forebrain regions. Likewise, a daily hypo-caloric diet affected differentially the phase and amplitude of clock genes in these structures (Feillet et al., 2008).

The aim of the present study was thus to go further in this analysis and to determine whether the hypothalamic regions involved in energy balance and feeding behaviour which express food-entrained temporal profiles of *Per1*, also express daily food-entrained rhythms of *Per2* and *Bmal1* and whether their response to meal time is reset with a similar phase.

METHODS

Animals and housing conditions

Adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing 250-280g were obtained from the general bioterium of the Faculty of Medicine of Universidad Nacional Autónoma de México. The experimental procedures were approved by the Biosecurity and Bioethics Committee, Faculty of Medicine, UNAM, in strict accordance with the Mexican norms for animal handling Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering and the study was consistent with the ethical standards established by the journal (Portaluppi et al., 2008).

Rats were housed in groups of 6 animals and maintained at constant temperature (22 ± 1 °C) with a 12:12 light-dark cycle; lights on at 06:00 h, defined as ZT0 lights off at 18:00 defined as ZT12.

Water and regular laboratory rodent diet (Purina, Chow 5001; Woodstock, Ontario, Canada) were provided throughout the study *ad libitum* unless otherwise stated. Rats were acclimated to environmental conditions for one week before starting the experimental protocol.

Groups and food entrainment

Rats were randomly assigned to control *ad libitum* (C) or to a restricted-feeding schedule (RF) group and were kept in groups of six animals of the same condition for three weeks in transparent acrylic cages (40 X 50 X 20 cm). The C group had free access to food through the experiment and RF had food available daily for two hours in the middle of the light period (ZT6-ZT8).

After three weeks of RFS, the rats from both groups, C and RF were decapitated every three hours (ZT0, ZT3, ZT6, ZT9, ZT12, ZT15, ZT18 and ZT21) to complete a 24 h cycle. At ZT6 RF brains were obtained before the daily food access. All brains were dissected and frozen in 2-methylbutane (Sigma) in less than one minute, and stored at -40 °C until sectioning.

***In situ* hybridization**

The hypothalamus (bregma -1.30 – -3.30; Paxinos & Watson, 1998) was cut in 20 µm thick coronal sections with a cryostat at -20°C and mounted directly on gelatin-coated slides. The antisense and sense RNA probes for *rPer1*, *rPer2* and *rBmal1* were generated with an *in vitro* transcription kit (Maxiscript, Ambion, TX) and were transcribed in presence of (³⁵S) UTP with T7 RNA polymerase for *Per 1* and *Per 2* and with T3 for *Bmal 1*.

The slides were removed from the freezer, warmed to room temperature and fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) for 15 min, rinsed twice with PBS for 5 min each and then acetylated twice in 0.1 M triethanol-amine for 10 min, washed twice with PBS and dehydrated in an ethanol series (70, 90, 65 and 100%). Sections were air-dried at room temperature and then were incubated at 54° C overnight with hybridization buffer containing 10⁷ cpm/mL of ³⁵S-labeled cRNA antisense probes. Slides were then cooled at room temperature coverslips were removed by dipping slides in 4X saline sodium citrate (SSC) and then rinsing them for 5 min. Slides were incubated for 30 min at 37° C in RNase buffer containing 0.1 mg/mL RNase (Sigma, St. Louis, MO). Slides were then rinsed twice in 2X SSC for 5 min each one and rinsed for 10min in 1X SSC, 0.5 SSC and 30 min in 0.1X SSC at 54° C. Finally slides were dehydrated in ethanol series (70, 90, 95 and 100%) and air dried.

Brain slices and radioactive standards (¹⁴C) in each cassette were included and exposed for 7 days to an autoradiographic film (Biomax, Kodak, France). Autoradiographs of brain sections and standards were scanned in a double-bed scanner (Epson perfection, 4180), and the images were saved in TIFF format. The optical density of *Per1*, *Per2* and *Bmal1* hybridization was measured in the SCN, ARC, PVN, DMH and VMH nuclei using the software ImageJ (NIH). Measures were obtained bilaterally from three consecutive slices and averaged for each animal (n = 4-6 per circadian point). The area of each nucleus was outlined for evaluating the intensity of the signal, and when virtually no signal was found, we used anatomical references to outline the corresponding nuclei. Data are expressed as relative optical density (OD) according to values calibrated with a ¹⁴C scale.

Statistical analysis

Data were organized by nutritional group and time point and are presented as mean values ± standard error (S.E.M.). Data were compared with two-way ANOVA for independent measurements for the factors nutritional group and time, and was followed by the post- hoc Tukey multiple comparisons test with p < 0.05.

RESULTS

In situ hybridization allowed detecting expression of *Per1*, *Per2* and *Bmal1* in all the hypothalamic nuclei. However, the intensity and the pattern of expression differed according to the clock gene and the studied nuclei (Figure 1).

In the SCN, clear diurnal rhythms were observed in the C group for the three studied clock genes. For *Per1*, peak values were observed at ZT6; for *Per2*, peak values were obtained at ZT12 and for *Bmal1*, highest and lowest levels were found during the dark and light phase, respectively. RFS produced a 3-h phase advance in *Per1*, while the phase in *Per2* and *Bmal1* remained unchanged (Figure 2, top). The two-way ANOVA indicated for the 3 clock genes a significant effect of time and no difference between groups. However, the ANOVA indicated a significant interaction of group X time for *Per1* confirming a difference between C and RF group (see Table 1).

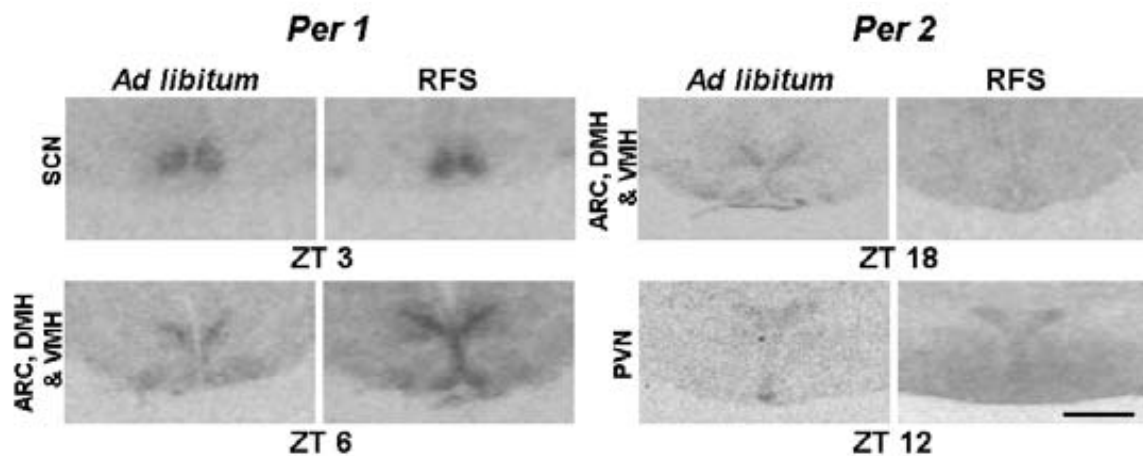


Figure 1: Representative autoradiographs of *in situ* hybridization of *Per1*, *Per2* and *Bmal1* in C and RF groups, at the level of the SCN, ARC, DMH PVN and VMH at different ZT points. Scale bar 500 μ m.

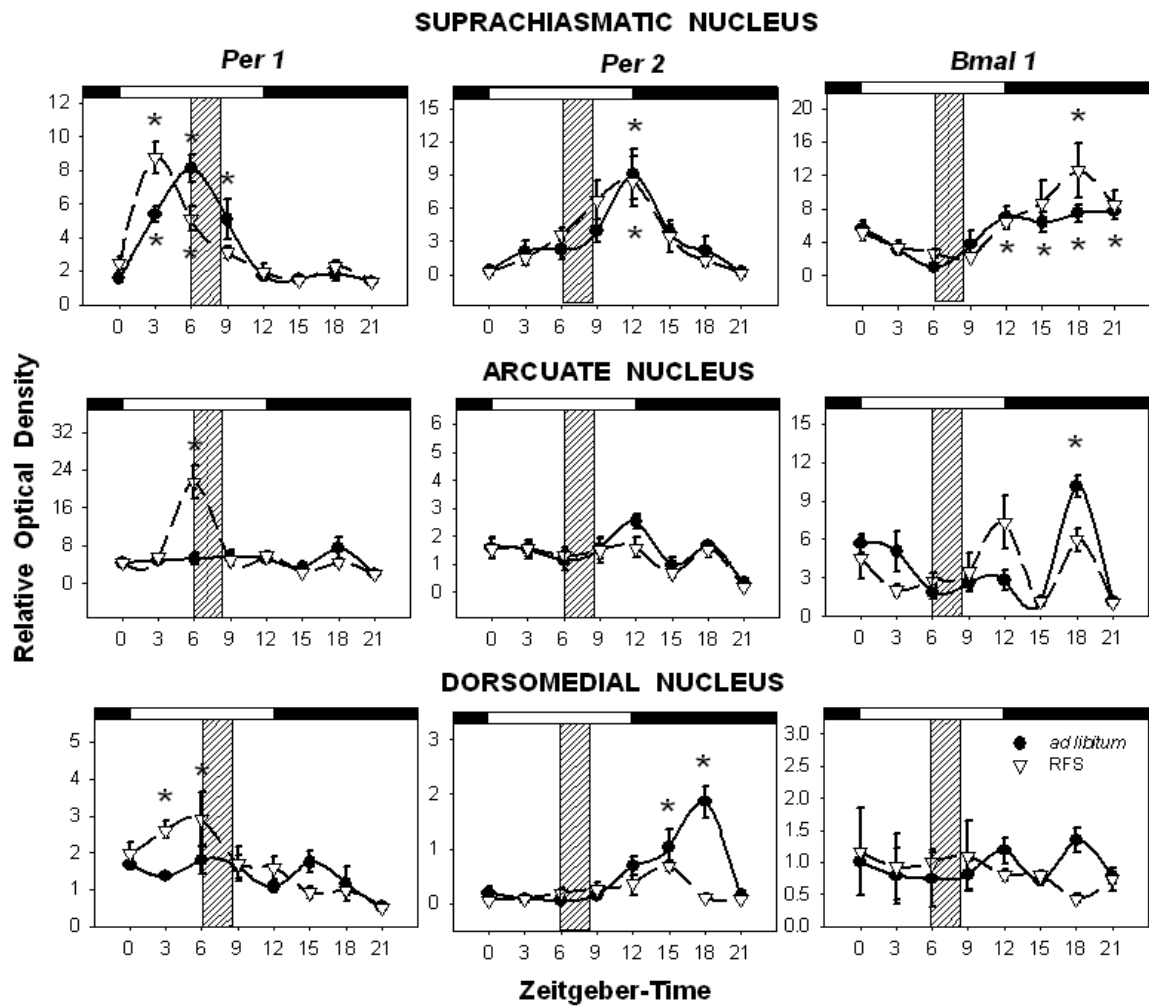


Figure 2: Relative optical density of *Per1*, *Per2* and *Bmal1* in C (black dots and continuous line) and RF (white triangles and dotted lines) groups at the level of the SCN, ARC and DMH hypothalamic nuclei, as determined by quantitative *in situ* hybridization. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 4-6 per circadian point). Asterisk and & indicate significant difference between highest and lowest values in the C and RF groups, respectively ($p \leq 0.01$).

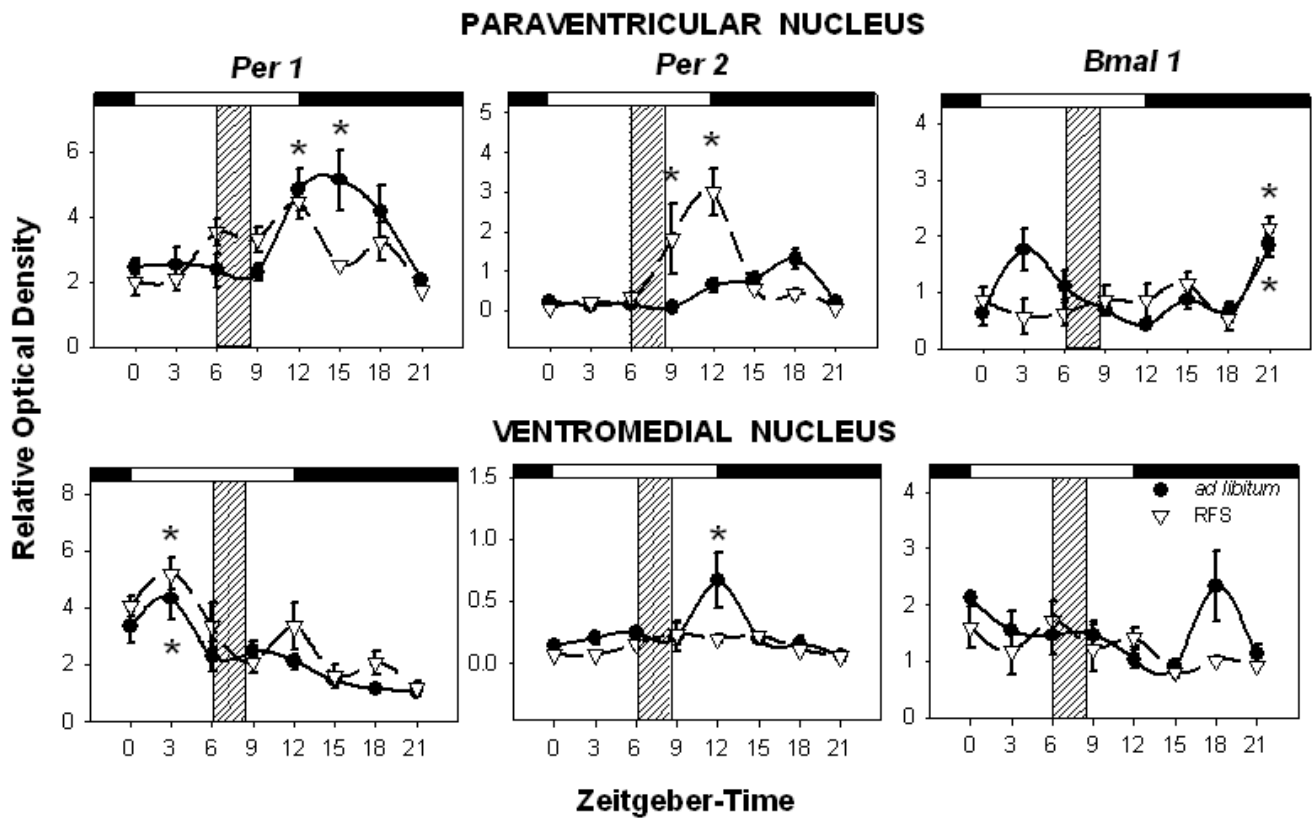


Figure 3: Circadian expression of *Per1*, *Per2* and *Bmal1* in C (black dots and continuous line) and RF (white triangles and dotted lines) groups in the PVN and the VMH nuclei. * indicates significant difference between highest and lowest values in the C group and & in the RF group ($p \leq 0.01$, $n = 4-6$ per circadian point).

Table 1. Results of the two-way ANOVA for three clock genes in hypothalamic nuclei.

HYPOTHALAMIC NUCLEUS		GROUP		TIME		INTERACTION	
SCN	<i>Per1</i>	F(1, 61) = 0.00	NS	F(7, 61) = 31.74	0.001	F(7, 61) = 5.57	0.001
	<i>Per2</i>	F(1, 61) = 0.10	NS	F(7, 61) = 11.70	0.001	F(7, 61) = 0.56	NS
	<i>Bmall</i>	F(1, 53) = 2.67	NS	F(7, 53) = 11.01	0.001	F(7, 53) = 1.32	NS
ARC	<i>Per1</i>	F(1, 56) = 5.59	0.02	F(7, 56) = 13.63	0.001	F(7, 56) = 11.01	0.001
	<i>Per2</i>	F(1, 60) = 1.34	NS	F(7, 60) = 6.13	0.001	F(7, 60) = 0.64	NS
	<i>Bmall</i>	F(1, 52) = 0.19	NS	F(7, 52) = 7.42	0.001	F(7, 52) = 2.99	0.01
DMH	<i>Per1</i>	F(1, 56) = 1.09	NS	F(7, 56) = 4.53	0.001	F(7, 56) = 2.69	0.01
	<i>Per2</i>	F(1, 61) = 16.68	0.001	F(7, 61) = 13.07	0.001	F(7, 61) = 9.87	0.001
	<i>Bmall</i>	F(1, 54) = 0.12	NS	F(7, 54) = 0.20	NS	F(7, 54) = 0.87	NS
PVN	<i>Per1</i>	F(1, 62) = 2.11	NS	F(7, 62) = 6.96	0.001	F(7, 62) = 2.70	0.01
	<i>Per2</i>	F(1, 61) = 6.85	0.01	F(7, 61) = 8.60	0.001	F(7, 61) = 7.51	0.001
	<i>Bmall</i>	F(1, 52) = 0.10	NS	F(7, 52) = 6.53	0.001	F(7, 52) = 2.37	0.03
VMH	<i>Per1</i>	F(1, 55) = 5.72	0.02	F(7, 55) = 12.12	0.001	F(7, 55) = 0.69	NS
	<i>Per2</i>	F(1, 59) = 7.10	0.009	F(7, 59) = 4.89	0.001	F(7, 59) = 2.44	0.02
	<i>Bmall</i>	F(1, 54) = 2.77	NS	F(7, 54) = 2.09	NS	F(7, 54) = 1.56	NS

SCN: suprachiasmatic nucleus; ARC: arcuate nucleus; DMH: dorsomedial nucleus; PVN: paraventricular nucleus;

VMH: ventromedial nucleus.

In the ARC, no diurnal rhythms were observed in the C group for *Per1* and *Per2*, but a significant nocturnal peak was found in *Bmall* expression. RFS during the light phase shifted the peak of *Per1* to ZT6, anticipating food access, and produced a non-significant increase of *Bmall* at ZT12, while *Per2* expression remained unchanged (Figure 2, middle). For *Per1* the two-way ANOVA indicated a significant difference between nutritional groups, for the 3 genes indicated a significant effect due to time and detected a significant interaction of group X time for *Per1* and *Bmall* (see Table 1).

In the DMH a clear diurnal rhythm was observed in the C group for *Per2* with a nocturnal peak at ZT18, while no diurnal rhythm was seen for *Per1* or *Bmall*. RFS induced rhythmicity of *Per1* expression with a peak at ZT6 preceding meal time, while the *Per2* oscillation was markedly dampened. No significant change in the temporal pattern of *Bmall* expression was observed (Figure 2 bottom). The two-way ANOVA confirmed a significant difference between nutritional groups for *Per2*, significant effects of time and significant group X time interaction for *Per1* and *Per2*, while no effect was obtained for *Bmall* (Table 1).

In the PVN of C rats, a clear diurnal rhythm was observed for *Per1* and *Bmall* with high values in early and late night, respectively, while no significant oscillations were observed for *Per2*. RFS during the light disturbed the nocturnal pattern of *Per1*. Interestingly, RFS induced a nocturnal peak at ZT12 for *Per2*, 6 h after meal time. In contrast, *Bmall* expression remained unchanged (Figure 3 top). The two-way ANOVA indicated a significant effect due to nutritional groups for *Per2* and significant time effect and group X time interaction for *Per1*, *Per2* and *Bmal 1*(see Table 1).

In the VMH the C group showed a daily peak in *Per1*, *Per2* and *Bmall* at ZT3, ZT12 and ZT18, respectively; however, this last result was not statistically significant. RFS abolished rhythmicity for *Per2* and *Bmall* expression, and produced a slight increase in the daily expression of *Per1* (Figure 3 bottom). Such effects were confirmed by the two-way ANOVA, indicating significant difference between nutritional groups and due to time for *Per1* and *Per2*, significant group X time interaction for *Per2*, and no effect for *Bmall* (Table 1).

DISCUSSION

Present data indicate that daily temporal patterns of *Per1*, *Per2* and *Bmall* are different among various hypothalamic structures under *ad libitum* conditions and that RFS do not lead to a uniform timing effect in clock gene expression throughout the hypothalamus. RFS exerted differential effects on clock genes either by up- or down-regulating their expression, by inducing phase changes or in some cases leaving them unaffected.

C rats, exhibited robust daily oscillations of *Per1*, *Per2* and *Bmall* in the SCN, site of the master clock in mammals. In contrast, in C rats other hypothalamic nuclei showed oscillations in one or two clock genes, but in no case in all. Significant peaks predominated in the dark phase. The finding of a daily rhythm of *Per2* in the DMH seems contradictory with previous studies that have not reported a rhythm of *Per2* under *ad libitum* condition (Mieda et al., 2006; Verwey et al., 2007), however both studies only report quantitative data of the protein and it is possible to observe a slight increase at ZT21.

In the present study we showed normo-caloric differential effect on clock genes; we did not evaluate body weight or food ingestion; however in a previous study we reported that rats adapt to this schedule and ingest in two hours approximately the same amount as free feed rats (Martínez-Merlos et al, 2004). A series of studies have reported that the SCN is not

necessary for food-entrainment (Stephan et al., 1979) and that RFS do not modify the expression of clock genes in the SCN (Damiola et al., 2000; Hara et al., 2001; Verwey et al., 2007; Wakamatsu et al., 2001). Contrary to those reports, we found a 3 h phase-shift of *Per1* in the SCN in response to RFS that fits with up-regulation of the protein *Per1* and c-FOS inhibition in that structure during food anticipation in RF rats (Angeles –Castellanos et al, 2008 and Escobar et al, 2007). A possible difference with such studies is the 3-week period during which rats were food-entrained. Studies reporting no changes on the SCN have exposed mice or rats to relatively brief intervals (6-8 days) of daily feeding schedules (Damiola et al., 2000; Hara et al., 2001; Wakamatsu et al., 2001). Thus the interval may be too short to observe a shift. Another parameter to take into account is the duration of daily food access, which was 2 h in the present study and can last up to 12 h in other studies that did not find changes in SCN timing (Damiola et al., 2000). A shorter window of daily food access could have more potent synchronizing effects on hypothalamic oscillators. Some reports using special mice strains or long intervals of restricted feeding conditions have also found effects on the SCN (Abe et al., 2007; Castillo et al., 2004). In arrhythmic rats due to prolonged housing under constant light, Lamont et al. (2005) restored *PER2* protein rhythm in the SCN with daily 3 h feeding schedules. However, no phase change in *PER2* oscillation was observed in the SCN of rats exposed to daytime restricted feeding with or without palatable food (Verwey et al., 2007). Finally, a daily hypo-caloric diet also induced a similar phase advance of *Per1* in mice as reported here in RF rats (Mendoza et al., 2005b). Altogether such findings point out interplay of feeding cues with the SCN and the possibility that under special conditions the SCN pacemaker can be reset by unknown input signals associated with feeding schedules.

In hypothalamic nuclei involved in metabolic and feeding functions, the main effect exerted by RFS was a shift or induction of *Per1* and *Per2* mRNA expression, with a peak around meal time. Importantly, in this study RFS affected differentially the clock components in hypothalamic nuclei, as previously reported (Feillet et al., 2008). As detailed below, these observations indicate that in hypothalamic oscillators, clock genes have independent daily oscillations with different sensitivities to entraining feeding stimuli.

In the ARC, RFS elicited a peak of *Per1* expression at ZT6 anticipating food access, which is in agreement with a previous study where we previously reported induction of *PER1* protein with peak values at ZT12 (Angeles-Castellanos et al., 2008) and up-regulation and phase advance of *PER1* and *PER2* by hypo-caloric feeding in mice (Feillet et al., 2008). This effect is not surprising since the ARC is the main entrance of hormonal and metabolic signals to the hypothalamus (Hill et al., 2008).

The role of the DMH in food entrainment is controversial due to the contradictory results reported by different groups (Gooley et al; 2006; Landry et al, 2007; Landry & Mistlberger 2007 and Mistlberger et al, 2008). Present data contribute to this controversy, since we have observed a dampening of *Per2* in RF rats. Induction of *Per1* expression in the DMH by RFS confirms previous results (Gooley et al., 2006; Mieda et al., 2006), however do not agree with an up-regulation of *PER2* protein in the DMH of rats exposed to daytime restricted rich diet as described by Verwey et al. (2007) and with the induction of a *Per2* RNA rhythm in mice reported by Mieda et al, (2006). However it is important to point out that one study used a high caloric diet, which can induce a different metabolic state (Verwey et al., 2007) and the other study (Mieda et al, 2006) does not provide quantification of the *Per2* RNA expression. Finally another factor influencing our present results could be the housing conditions of the rats, because in this study the social interaction between rats could have influenced the RFS. It is well documented that the DMH regulates arousal related with circadian rhythms and feeding (Aston-Jones et al, 2001). Thus a conclusive role of the DMH will need uniformity in experimental protocols.

Based on c-FOS activity the VMH has also been proposed as the initiating structure for anticipatory activity (Ribeiro et al, 2007); in the present study no significant changes of clock genes were observed in RF rats, thus the role of the VMH as a putative food entrained oscillator is also doubtful.

In the PVN it is interesting to note that the post-prandial expression of *Per2* coincides with a specific induction of *c-fos* mRNA and protein in the PVN (Ángeles-Castellanos et al., 2004; Poulin & Timofeeva, 2008). This meal induced pattern may be the response to digestive processes and has been observed in other relay structures providing input signals elicited by feeding to the brain (Ángeles-Castellanos et al., 2005 and Mieda et al., 2006).

The lack of synchrony among clock genes in the different hypothalamic structures has previously been reported by different groups. Nakamura et al. (2005) showed with the *Per1*-luc reporter a desynchronous and asymmetric adjustment among regions in the SCN after light pulses or phase shifts. Likewise, Yan and Okamura (2002) found that the phase and amplitude of clock genes are not expressed uniformly throughout the SCN. Present evidence suggests that this can also happen in other brain areas, since *Per1* and *Per2* expression in hypothalamic nuclei are neither uniformly expressed, nor identically phased. This particularity of extra- SCN oscillators was previously described in forebrain structures of mice entrained with a hypo-caloric diet (Feillet et al., 2008). Present data provide evidence that this desynchrony occurs also after normo-caloric food entrainment. The lack of regular orchestration of clock genes in these structures may be the cause of the dampening of extra-SCN oscillations.

In conclusion, during the last 30 years numerous experimental data have been collected that support the existence of endogenous time-keeping systems able to predict, anticipate and respond to feeding opportunities. A number of hypothalamic nuclei exhibit oscillations of clock genes driven or strongly modulated by feeding schedules; however, they are not driven uniformly. Such findings do not provide evidence of a localized food entrained oscillator in the hypothalamus and rather suggest a system of multiple food driven oscillator. The lack of concerted oscillations in hypothalamic nuclei may participate to their weak or dampening oscillations as compared with those in the SCN. Further studies will need to define the cellular pathways that link feeding cues with the induction or modifications of clock gene oscillations.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by ECOS México-France M04S02. MCMS received PhD fellowship by CONACYT and DGEP, posgrado en ciencias biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México; and CONACYT 43950-M.

REFERENCES

- Abe H, Honma S, Honma K. (2007). Daily restricted feeding reset the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus of CS mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292: R607-R615.
- Ángeles-Castellanos M, Aguilar-Roblero R, Escobar C. (2004). C-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286: R158-R165.
- Ángeles-Castellanos M, Mendoza J, Diaz-Muñoz M, Escobar C. (2005). Food entrainment modifies the c-Fos expression pattern in brain stem nuclei of rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288: R678-R684.
- Ángeles-Castellanos M, Mendoza J, Escobar C. (2007). Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein *Per1* immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience.* 144: 344-355.

- Angeles-Castellanos M, Salgado-Delgado R, Rodriguez K, Buijs RM, Escobar C. (2008). Expectancy for food or expectancy for chocolate reveals timing systems for metabolism and reward. *Neuroscience*. 155: 297-307.
- Aston-Jones G, Chen S, Zhun Y, Oshinsky ML. (2001). A neural circuit for circadian regulation of arousal. *Nat. Neurosci.* 4: 732-738.
- Castillo MR, Hochstetler KJ, Tavernier RJ Jr, Greene DM, Bult-Ito A. (2004). Entrainment of the master circadian clock by scheduled feeding. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287: R551-R555.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14: 2950-2961.
- Davidson AJ, Stephan FK. (1999). Plasma glucagon, glucose, insulin, and motilin in rats anticipating daily meals. *Physiol. Behav.* 66: 309-315.
- Diaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Aguilar-Roblero R, Escobar C. (2000). Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279: R2048-R2056.
- Escobar C, Diaz-Muñoz M, Encinas F, Aguilar-Roblero R. (1998). Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 274: R1309-R1316.
- Escobar C, Martínez-Merlos MT, Ángeles-Castellanos M, del Carmen Miñana M, Buijs RM. (2007). Unpredictable feeding schedules unmask a system for daily resetting of behavioural and metabolic food entrainment. *Eur. J. Neurosci.* 26: 2804-2814.
- Feillet CA, Mendoza J, Albrecht U, Pevet P, Challet E. (2008). Forebrain oscillators ticking with different clock hands. *Mol. Cell. Neurosci.* 37: 209-221.
- Gooley JJ, Schomer A, Saper CB. (2006). The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat. Neurosci.* 9: 398-407.
- Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S. (2001). Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells.* 6: 269-278.
- Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. (2008). Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294: E827-E832.
- Honma KI, Honma S, Hiroshige T. (1983). Critical role of food amount for prefeeding corticosterone peak in rats. *Am. J. Physiol.* 245: R339-R344.
- Krieger DT, Hauser H, Krey LC. (1977). Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Science*. 197: 398-399.
- Lamont EW, Diaz LR, Barry-Shaw J, Stewart J, Amir S. (2005). Daily restricted feeding rescues a rhythm of period2 expression in the arrhythmic suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*. 132: 245-248.
- Landry GJ, Yamakawa GR, Webb IC, Mear RJ, Mistlberger RE. (2007). The dorsomedial hypothalamic nucleus is not necessary for the expression of circadian food-anticipatory activity in rats. *J. Biol. Rhythms.* 22: 467-478.
- Landry GJ, Mistlberger RE. (2007). Food entrainment: methodological issues. *J. Biol. Rhythms.* 22: 484-487.
- Martínez-Merlos MT, Ángeles-Castellanos M, Díaz-Muñoz M, Aguilar-Roblero R, Mendoza J, Escobar C. (2004). Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator. *J. Endocrinology.* 181: 53-63.
- Mendoza J, Ángeles-Castellanos M, Escobar C. (2005a). A daily palatable meal without food deprivation entrains the suprachiasmatic nucleus of rats. *Eur. J. Neurosci.* 22: 2855-2862.
- Mendoza J, Graff C, Dardente H, Pevet P, Challet E. (2005b). Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J. Neurosci.* 25: 1514-1522.
- Meynard MM, Valdès JL, Recabarren M, Serón-Ferrè M, Torrealba F. (2005). Specific activation of histaminergic neurons during daily feeding anticipatory behavior in rats. *Behav. Brain Res.* 158: 311-319.
- Mieda M, Williams SC, Richardson JA, Tanaka K, Yanagisawa M. (2006). The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 12150-12155.
- Mistlberger RE. (1994). Circadian food-anticipatory activity: Formal models and physiological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18: 171-195.
- Mistlberger RE, Yamazaki S, Pendergast JS, Landry GJ, Takumi T, Nakamura W. (2008). Comment on "Differential rescue of light- and food- entrainable circadian rhythms". *Science*. 322: 675.
- Nakamura W, Yamazaki S, Takasu NN, Mishima K, Block GD. (2005). Differential response of Period 1 expression with the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* 25: 5481-5487.
- Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K. (2002). Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell. Tissue. Res.* 309: 47-56.
- Portaluppi F, Touitou Y, Smolensky MH. (2008). Ethical and methodological standards for laboratory and medical biological rhythm research. *Chronobiol Int.* 25: 999-1016.

- Poulin AM, Timofeeva E. (2008). The dynamics of neuronal activation during food anticipation and feeding in the brain of food-entrained rats. *Brain Res.* 1227: 128-141.
- Ribeiro AC, Sawa E, Carren-LeSauter I, LeSauter J, Silver R, Pfaff DW. (2007). Two forces for arousal: Pitting hunger versus circadian influences and identifying neurons responsible for changes in behavioral arousal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 20078-20083.
- Stephan FK, Swann JM, Sisk CL. (1979). Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav. Neural. Biol.* 25: 545-554.
- Stephan FK. (1992). Resetting of a feeding-entrainable circadian clock in the rat. *Physiol. Behav.* 52: 985-995.
- Stephan, FK. (2002). The “other” circadian system: food as a Zeitgeber. *J. Biol. Rhythms.* 17: 284-292.
- Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science.* 29: 490-493.
- Verwey M, Khoja Z, Stewart J, Amir S. (2007). Differential regulation of the expression of Period2 protein in the limbic forebrain and dorsomedial hypothalamus by daily limited access to highly palatable food in food-deprived and free-fed rats. *Neuroscience.* 147: 277-285.
- Verwey M, Khoja Z, Stewart J, Amir S. (2008). Region-specific modulation of PER2 expression in the limbic forebrain and hypothalamus by nighttime restricted feeding in rats. *Neurosci. Lett.* 440: 54-58.
- Waddington-Lamont E, Harbour VL, Barry-Shaw J, Renteria Diaz L, Robinson B, Stewart J, Amir S. (2007). Restricted access to food, but not sucrose, saccharine, or salt, synchronizes the expression of Period2 protein in the limbic forebrain. *Neuroscience.* 144: 402-411.
- Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S. (2001). Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur. J. Neurosci.* 13: 1190-1196.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science.* 288: 682-685.
- Yan L, Okamura H. (2002). Gradients in the circadian expression of Per1 and Per2 genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 15: 1153-1162.

11. REFERENCIAS

- Aguayo-Mazzucato C, Sanchez-Soto C, Godinez-Puig V, Gutiérrez-Ospina G, Hiriart M. 2006. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS ONE*. 21: e35.
- Aguilar-Roblero R, Salazar-Juarez A, Rojas-Castañeda J, Escobar C, Cintra L. 1997. Organization of circadian rhythmicity and suprachiasmatic nuclei in malnourished rats. *Am J Physiol*. 273: R1321-R1331.
- Alvarez E, Fernández S, Blázquez E. 1986. Effect of maternal food restriction on circulating insulin and glucagon levels and on liver insulin and glucagon binding sites of fetal and suckling rats. *Diabete Metab*. 12: 337-345.
- Amen-Ra N. 2006. Humans are evolutionarily adapted to caloric restriction resulting from ecologically dictated dietary deprivation imposed during the Plio-Pleistocene period. *Med Hypotheses*. 66: 978-984.
- Ángeles-Castellanos M, Aguilar-Roblero R, Escobar C. 2004. c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 286: R158-R165.
- Ao Y, Wu S, Go VL, Toy N, Yang H. 2005. Maintaining euglycemia prevents insulin-induced Fos expression in brain autonomic regulatory circuits. *Pancreas*. 31: 142-147.
- Arora S, Anubhuti. 2006. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity—a review. *Neuropeptides*. 40: 375-401.
- Barbosa FB, Capito K, Kofod H, Thams P. 2002. Pancreatic islet insulin secretion and metabolism in adult rats malnourished during neonatal life. *Br J Nutr*. 87: 147-155.
- Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. 1989. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*. 298: 564-567.
- Barth E, Albuszies G, Baumgart K, Matejovic M, Wachter U, Vogt J, Radermacher P, Calzia E. 2007. Glucose metabolism and catecholamines. *Crit Care Med*. 35: S508-S518.
- Bautista CJ, Boeck L, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. 2008. Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. *Pediatr Res*. 63: 358-363.
- Becskei C, Lutz TA, Riediger T. 2008. Glucose reverses fasting-induced activation in the arcuate nucleus of mice. *Neuroreport*. 19: 105-109.
- Bernardis LL, Bellinger LL. 1996. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 20:189-287.
- Berney DM, Desai M, Palmer DJ, Greenwald S, Brown A, Hales CN, Berry CL. 1997. The effects of maternal protein deprivation on the fetal rat pancreas: major structural changes and their recuperation. *J Pathol*. 183: 109-115.
- Berthoud HR. 2002. Multiple neural system controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev*. 26: 393-428.
- Bertram CE, Hanson MA. 2002. Prenatal programming of postnatal endocrine responses by glucocorticoids. *Reproduction*. 124: 459-467.
- Bi S, Ladenheim EE, Schwartz GJ, Moran TH. 2001. A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 281: R254-R260.
- Bi S, Robinson BM, Moran TH. 2003. Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285: R1030-R1036.
- Bieswal F, Ahn MT, Reusens B, Holvoet P, Raes M, Rees WD, Remacle C. 2006. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity*. 14: 1330-1343.
- Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, Ezzati M, Mathers C, Rivera J; Maternal and Child Undernutrition Study Group. 2008. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet*. 371: 243-260.
- Breton C, Lukaszewski MA, Risold PY, Enache M, Guillemot J, Rivière G, Delahaye F, Lesage J, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Vieau D. 2009. Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 296: E462-472.
- Burns SP, Desai M, Cohen RD, Hales CN, Iles RA, Germain JP, Going TC, Bailey RA. 1997. Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J Clin Invest*. 100: 1768-1774.
- Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JR, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams G. 1999. Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes*. 48: 2132-2137.
- Chamson-Reig A, Thyssen SM, Arany E, Hill DJ. 2006. Altered pancreatic morphology in the offspring of pregnant rats given reduced dietary protein is time and gender specific. *J Endocrinol*. 191: 83-92.

- Chang GQ, Gaysinskaya V, Karatayev O, Leibowitz SF. 2008. Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J Neurosci.* 28:12107–12119
- Cintra L, Galván A, Díaz-Cintra S, Escobar C. 1994. Protein malnutrition on suprachiasmatic nucleus cells in rats of three ages. *Bol Estud Med Biol.* 42: 11-19.
- Cone RD. 2005. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci.* 8: 571-578.
- Coupé B, Grit I, Darmaun D, Parnet P. 2009. The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 297: R813-R824.
- Dabelea D, Pettitt DJ, Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH, Knowler WC. 1999. Birth weight, type 2 diabetes, and insulin resistance in Pima Indian children and young adults. *Diabetes Care.* 22: 944-950.
- Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C, Hoet JJ. 1991. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes.* 40: 115-120.
- Darcel N, Fromentin G, Raybould HE, Gougis S, Gietzen DW, Tomé D. 2005. Fos-positive neurons are increased in the nucleus of the solitary tract and decreased in the ventromedial hypothalamus and amygdala by a high-protein diet in rats. *J Nutr.* 135: 1486-1490.
- de Moura EG, Passos MC. 2005. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep.* 25: 251-269.
- Delahaye F, Breton C, Risold PY, Enache M, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Lesage J, Vieau D. 2008. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology.* 149: 470-475.
- Desai M, Byrne CD, Meeran K, Martenz ND, Bloom SR, Hales CN. 1997. Regulation of hepatic enzymes and insulin levels in offspring of rat dams fed a reduced-protein diet. *Am J Physiol.* 273: G899-904.
- Desai M, Crowther NJ, Lucas A, Hales CN. 1996. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br J Nutr.* 76: 591-603.
- Desai M, Crowther NJ, Ozanne SE, Lucas A, Hales CN. 1995. Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem Soc Trans.* 23: 331-335.
- Díaz-Cintra S, González-Maciél A, Morales MA, Aguilar A, Cintra L, Prado-Alcalá RA. 2007. Protein malnutrition differentially alters the number of glutamic acid decarboxylase-67 interneurons in dentate gyrus and CA1–3 subfields of the dorsal hippocampus. *Exp Neurol.* 208: 47-53.
- Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Aguilar-Roblero R, Escobar C. 2000. Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279: R2048-R2056.
- Dobbing J. 1968. Vulnerable periods in developing brain. In: Davison, A.N.; Dobbing J., eds. Applied neurochemistry. Philadelphia: F. A. Davis Co. p287-316.
- Dollet JM, Beck B, Villaume C, Max JP, Debry G. 1985. Progressive adaptation of the endocrine pancreas during long-term protein deficiency in rats: effects on blood glucose homeostasis and on pancreatic insulin, glucagon and somatostatin concentrations. *J Nutr.* 115: 1581-1588.
- Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. 2007. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Ann Rev Nutr.* 27: 79-101.
- Dunn-Meynell AA, Govek E, Levin BE. 1997. Intracarotid glucose selectively increases Fos-like immunoreactivity in paraventricular, ventromedial and dorsomedial nuclei neurons. *Brain Res.* 748; 100-106.
- Elverdin JC, Chiarenza AP, Luchelli MA, Vatta M, Bianciotti LG, Boyer P, Vacas MI. 2006. Protein free diet feeding: effects on sympathetic activity and salivary evoked secretion in the submandibular gland of the rat. *Arch Oral Biol.* 51: 621-628.
- Encuesta Nacional de Nutrición 1999 (ENN 1999). Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, González-de Cossio T, Hernández-Prado B, Sepúlveda J. 2001. Estado Nutricio en Niños y Mujeres en México. Cuernavaca, Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Pública. p320.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006). Rivera-Dommarco J, Cuevas Nasu L, Shamah Levy T, Villalpando Hernández S, Avila Arcos MA, Jiménez Aguilar A. 2006. Estado Nutricio en Niños y Mujeres en México. Cuernavaca, Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Pública. p131.
- Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Santos-Silva AP, Oliveira ED, Trevenzoli IH, Casimiro-Lopes G, Nogueira-Neto JF, Lisboa PC. 2009. Temporal evaluation of body composition, glucose homeostasis and lipid profile of male rats programmed by maternal protein restriction during lactation. *Horm Metab Res.* 11.
- Feoli AM, Leite MC, Tramontina AC, Tramontina F, Posser T, Rodrigues L, Swarowsky A, Quincozes-Santos A, Leal RB, Gottfried C, Perry ML, Gonçalves CA. 2008. Developmental changes in content of glial marker proteins in rats exposed to protein malnutrition. *Brain Res.* 1187: 33-41.

- Fiat AM, Jollès P. 1989. Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects. *Mol Cell Biochem.* 87: 5-30.
- Flores H, Sierralta W, Monckeberg F. 1970. Triglyceride transport in protein-depleted rats. *J Nutr.* 100: 375-379.
- Forsdahl A. 1977. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br J Prev Soc Med.* 31; 91-95.
- Gamallo JL, Perry ML, Trindade VM, Pereira IR, Bernard EA. 1989. Effect of pre- and postnatal protein undernutrition on glycemia, ketonemia and liver glycogen concentration in suckling rats. *Ann Nutr Metab.* 33; 266-270.
- Garofano A, Czernichow P, Bréant B. 1997. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia.* 40: 1231-1234.
- Gesina E, Blondeau B, Milet A, Le Nin I, Duchene B, Czernichow P, Scharfmann R, Tronche F, Breant B. 2006. Glucocorticoid signaling affects pancreatic development through both direct and indirect effects. *Diabetologia.* 49: 2939-2947.
- Ginger MR, Grigor MR. 1999. Comparative aspects of milk caseins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 124: 133-145.
- Ginsberg HN, Illingworth DR. 2001. Postprandial dyslipidemia: an atherogenic disorder common in patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 88: 9H-15H.
- Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A. 2005. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res.* 36: 232-240.
- Gosby AK, Maloney CA, Phuyal JL, Denyer GS, Bryson JM, Caterson ID. 2003. Maternal protein restriction increases hepatic glycogen storage in young rats. *Pediatr Res.* 54: 413-418.
- Gouache P, Le Moullac B, Bleiberg-Daniel F, Aubert R, Flament C. 1991. Changes in rat plasma apolipoproteins and lipoproteins during moderate protein deficiency: potential use in the assessment of nutritional status. *J Nutr.* 121: 653-662.
- Granados-Rojas L, Aguilar A, Díaz-Cintra S. 2004. The mossy fiber system of the hippocampal formation is decreased by chronic and postnatal but not by prenatal protein malnutrition in rats. *Nutr Neurosci.* 7: 301-308.
- Gravena C, Andreazzi AE, Mecabo FT, Grassioli S, Scantamburlo VM, Mathias PC. 2007. Protein restriction during lactation alters the autonomic nervous system control on glucose-induced insulin secretion in adult rats. *Nutr Neurosci.* 10: 79-87.
- Grove KL, Smith MS. 2003. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiol Behav.* 79: 47– 63.
- Guillod-Maximin E, Lorsignol A, Alquier T, Pénicaud L. 2004. Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats. *J Neuroendocrinol.* 16: 464-471.
- Hales CN, Barker DJ. 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 35: 595-601.
- Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD. 1991. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ.* 303: 1019-1022.
- Hales CN, Desai M, Ozanne SE, Crowther NJ. 1996. Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem Soc Trans.* 24: 341-350.
- Hicks JJ. 2001. Bioquímica. Mc Graw-Hill Interamericana. México, D.F. p49-60.
- Icaza SJ, Béhar M. 1981. Nutrición. 2ª. Nueva editorial Interamericana. México, D. F. p250.
- Jolicoeur FB, Bouali SM, Fournier A, St-Pierre S. 1995. Mapping of hypothalamic sites involved in the effects of NPY on body temperature and food intake. *Brain Res Bull.* 36: 125-129.
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. 1999. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev.* 20: 68-100.
- Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG. 2006. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J Physiol.* 572: 31-44.
- Kehoe P, Mallinson K, Bronzino J, McCormick CM. 2001. Effects of prenatal protein malnutrition and neonatal stress on CNS responsiveness. *Brain Res Dev Brain Res.* 132: 23-31.
- Langley-Evans SC, Gardner DS, Jackson AA. 1996. Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Nutr.* 126: 1578-1585.
- Latorraca MQ, Carneiro EM, Boschero AC, Mello MA. 1998. Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in weaned rats. *Br J Nutr.* 80: 291-297.
- Leibowitz SF, Wortley KE. 2004. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides.* 25: 473-504.
- Lieberman LS. 2003. Dietary, evolutionary, and modernizing influences on the prevalence of type 2 diabetes. *Ann Rev Nutr.* 23: 345-377.

- Lobe SL, Bernstein MC, German RZ. 2006. Life-long protein malnutrition in the rat (*Rattus norvegicus*) results in altered patterns of craniofacial growth and smaller individuals. *J Anat.* 208: 795-812.
- López M, Tovar S, Vázquez MJ, Williams LM, Diéguez C. 2007. Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc.* 66; 131-155.
- Lucas A. 1991. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* 156: 38-50.
- Lucas A. 1998. Programming by early nutrition. An experimental approach. *J Nutr.* 128: 401S-406S.
- Lynch RM, Tompkins LS, Brooks HL, Dunn-Meynell AA, Levin BE. 2000. Localization of glucokinase gene expression in the rat brain. *Diabetes.* 49; 693-700.
- Ma L, Hanson RL, Que LN, Cali AM, Fu M, Mack JL, Infante AM, Kobes S; International Type 2 Diabetes Consortium, Bogardus C, Shuldiner AR, Baier LJ. 2007. Variants in ARHGEF11, a candidate gene for the linkage to type 2 diabetes on chromosome 1q, are nominally associated with insulin resistance and type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes.* 56: 1454-1459.
- Mardon J, Zangarelli A, Walrand S, Davicco MJ, Lebecque P, Demigné C, Horcajada MN, Boirie Y, Coxam V. 2008. Impact of energy and casein or whey protein intake on bone status in a rat model of age-related bone loss. *Br J Nutr.* 99: 764-772.
- Marty N, Dallaporta M, Thorens B. 2007. Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology.* 22: 241-251.
- Mayor F, Cuezva JM. 1985. Hormonal and metabolic changes in the perinatal period. *Biol Neonate.* 48: 185-196.
- McCarthy HD. 2006. Body fat measurements in children as predictors for the metabolic syndrome: focus on waist circumference. *Proc Nutr Soc.* 65. 385-392.
- McMillen IC, Robinson JS. 2005. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev.* 85: 571-633.
- Mendoza J, Graff C, Dardente H, Pevet P, Challet E. 2005. Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J Neurosci.* 25: 1514-1522.
- Millington GW. 2007. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr Metab.* 4: 18.
- Miñana-Solis M del C, Escobar C. 2006. Increased susceptibility to metabolic alterations in young adult females exposed to early malnutrition. *Nutr Neurosci.* 3: 12-19.
- Morgan JI, Curran T. 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci.* 14: 421-451.
- Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. 1993. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 17: 91-128.
- Morgane PJ, Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hall R, Bronzino J, Kissane J, Hawrylewicz E, Resnick O. 1978. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav Rev.* 2: 137-230.
- Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev.* 26: 471-483.
- Mountjoy PD, Rutter GA. 2007. Glucose sensing by hypothalamic neurones and pancreatic islet cells: AMPle evidence for common mechanism? *Exp Physiol.* 92: 311-319.
- Murphy HC, Regan G, Bogdarina IG, Clark AJ, Iles RA, Cohen RD, Hitman GA, Berry CL, Coade Z, Petry CJ, Burns SP. 2003. Fetal programming of perivenous glucose uptake reveals a regulatory mechanism governing hepatic glucose output during refeeding. *Diabetes.* 52: 1326-1332.
- Neel JV. 1962. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet.* 14: 353-362.
- Nehlig A. 1997. Cerebral energy metabolism, glucose transport and blood flow: changes with maturation and adaptation to hypoglycaemia. *Diabetes Metab.* 23: 18-29.
- Norsted E, Gömüç B, Meister B. 2008. Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the mediobasal hypothalamus. *J Chem Neuroanat.* 36: 107-121.
- Ñúñez-Farfán J, Eguiarte EL. 1999. La evolución Biológica. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología, CONABIO. Editorial y Litografía Regina de los Ángeles, S.A. México, D.F. p457.
- Orozco-Sólis R, Lopes de Souza S, Barbosa Matos RJ, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, Manhães de Castro R, Bolaños-Jiménez F. 2009. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav.* 96: 481-492.
- Orsini JC, Armstrong DL, Wayner MJ. 1992. Responses of lateral hypothalamic neurons recorded in vitro to moderate changes in glucose concentration. *Brain Res Bull.* 29:503-505.
- Ozanne SE, Wang CL, Coleman N, Smith GD. 1996. Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *Am J Physiol.* 271: E1128-E1134.
- Ozanne SE, Wang CL, Petry CJ, Smith JM, Hales CN. 1998. Ketosis resistance in the male offspring of protein-malnourished rat dams. *Metabolism.* 47: 1450-1454.

- Petrik J, Reusens B, Arany E, Remacle C, Coelho C, Hoet JJ, Hill DJ. 1999. A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology*. 140: 4861-4873.
- Petry CJ, Dorling MW, Wang CL, Pawlak DB, Ozanne SE. 2000. Catecholamine levels and receptor expression in low protein rat offspring. *Diabet Med*. 17: 848-853.
- Petry CJ, Ozanne SE, Hales CN. 2001. Programming of intermediary metabolism. *Mol Cell Endocrinol*. 185: 81-91.
- Plagemann A, Harder T, Rake A, Janert U, Melchior K, Rohde W, Dörner G. 1999. Morphological alterations of hypothalamic nuclei due to intrahypothalamic hyperinsulinism in newborn rats. *Int J Dev Neurosci*. 17: 37-44.
- Plagemann A, Harder T, Rake A, Melchior K, Rohde W, Dörner G. 2000a. Hypothalamic nuclei are malformed in weaning offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutr*. 130: 2582-2589.
- Plagemann A, Waas T, Harder T, Rittel F, Ziska T, Rohde W. 2000b. Hypothalamic neuropeptide Y levels in weaning offspring of low-protein malnourished mother rats. *Neuropeptides*. 34: 1-6.
- Poulin AM, Timofeeva E. 2008. The dynamics of neuronal activation during food anticipation and feeding in the brain of food-entrained rats. *Brain Res*. 1227: 128-141.
- Prescott JM, Read MS, Coursin DB. 1975. Brain function and malnutrition. Neuropsychological methods of assessment. John Wiley and SONS, New York. p103-112.
- Pucciarelli HM, Goya RG. 1983. Effects of post-weaning malnutrition on the weight of the head components in rats. *Acta Anat*. 115: 231-237.
- Racotta R. 2002. Metabolismo energético en el humano. Un enfoque cuantitativo. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. p288.
- Rao RH. 1995a. Fasting glucose homeostasis in the adaptation to chronic nutritional deprivation in rats. *Am J Physiol*. 268: E873-E879.
- Rao RH. 1995b. Adaptations in glucose homeostasis during chronic nutritional deprivation in rats: hepatic resistance to both insulin and glucagon. *Metabolism*. 44: 817-824.
- Rees WD, Hay SM, Cruickshank M, Reusens B, Remacle C, Antipatis C, Grant G. 2006. Maternal protein intake in the pregnant rat programs the insulin axis and body composition in the offspring. *Metabolism*. 55: 642-649.
- Reichling TD, German RZ. 2000. Bones, muscles and visceral organs of protein-malnourished rats (*Rattus norvegicus*) grow more slowly but longer durations to reach normal final size. *J Nutr*. 130: 2326-2332.
- Remacle C, Bieswal F, Reusens B. 2004. Programming of obesity and cardiovascular disease. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 28: S46-S53.
- Remmers F, Verhagen LA, Adan RA, Delemarre-van de Waal HA. 2008. Hypothalamic neuropeptide expression of juvenile and middle-aged rats after early postnatal food restriction. *Endocrinology*. 149:3617-3625.
- Resnick O, Morgane PJ, Hasson R, Miller M. 1982. Overt and hidden forms of chronic malnutrition in the rat and their relevance to man. *Neurosci Biobehav Rev*. 6: 55-75.
- Riediger T, Bothe C, Becskei C, Lutz TA. 2004. Peptide YY directly inhibits ghrelin-activated neurons of the arcuate nucleus and reverses fasting-induced c-Fos expression. *Neuroendocrinology*. 79: 317-326.
- Ronayne De Ferrer PA, Sambucetti ME. 1993. Casein to whey protein ratio in rat and human milks: effects of maternal protein intake. *J Dairy Sci*. 76: 1645-1653.
- Roseboom T, de Rooij S, Painter R. 2006. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev*. 82: 485-491.
- Rosene DL, Lister JP, Schwagerl AL, Tonkiss J, McCormick CM, Galler JR. 2004. Prenatal protein malnutrition in rats alters the c-Fos response of neurons in the anterior cingulate and medial prefrontal region to behavioral stress. *Nutr Neurosci*. 7: 281-289.
- Sakurai T. 2006. Roles of orexins and orexin receptors in central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 5: 313-325.
- Sadiq HF, Das UG, Tracy TF, Devaskar SU. 1999. Intra-uterine growth restriction differentially regulates perinatal brain and skeletal muscle glucose transporters. *Brain Res*. 823: 96-103.
- Samra JS. 2000. Regulation of lipid metabolism in adipose tissue. *Proc Nutr Soc*. 59: 441-446.
- Schulz LO, Bennett PH, Ravussin E, Kidd JR, Kidd KK, Esparza J, Valencia ME. 2006. Effects of traditional and western environments on prevalence of type 2 diabetes in Pima Indians in Mexico and the U.S. *Diabetes Care*. 29: 1866-1871.
- Silver IA, Erecińska M. 1998. Glucose-induced intracellular ion changes in sugar-sensitive hypothalamic neurons. *J Neurophysiol*. 79: 1733-1745.
- Simpson IA, Appel, NM, Hokari M, Oki J, Holman GD, Maher F, Koehler-Stec EM, Vannucci SJ, Smith OR. 1999. Blood-brain barrier glucose transporter: effects of hypo- and hyperglycemia revisited. *J Neurochem*. 72: 238-247.

- Snoeck A, Remacle C, Reusens B, Hoet JJ. 1990. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate*. 57: 107-118.
- Solomon TP, Sistrun SN, Krishnan RK, Del Aguila LF, Marchetti CM, O' Carroll SM, O' Leary VB, Kirwan JP. 2008. Exercise and diet enhance fat oxidation and reduce insulin resistance in older obese adults. *J Appl Physiol*. 104: 1313-1319.
- Srinivasan TN. 1983. Measuring malnutrition. *Ceres*. 16: 23-27.
- Tsigos C, Chrousos GP. 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom*. 53: 865-871.
- Thompson NM, Norman AM, Donkin SS, Shankar RR, Vickers MH, Miles JL, Breier BH. 2007. Prenatal and postnatal pathways to obesity: different underlying mechanisms, different metabolic outcomes. *Endocrinology*. 148:2345–2354.
- Tovar AR, Ascencio C, Torres N. 2002. Soy protein, casein, and zein regulate histidase gene expression by modulating serum glucagon. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 283: E1016–E1022.
- Vannucci SJ, Clark RR, Koehler-Stec E, Li K, Smith CB, Davies P, Maher F, Simpson IA. 1998. Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral glucose utilization. *Dev Neurosci*. 20: 369-379.
- Veneman AM. 2006. Global childhood malnutrition. *The Lancet*. 367: 1459.
- Verwey M, Khoja Z, Stewart J, Amir S. 2007. Differential regulation of the expression of Period2 protein in the limbic forebrain and dorsomedial hypothalamus by daily limited access to highly palatable food in food-deprived and free-fed rats. *Neuroscience*. 147: 277–285.
- Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH, Harris M. 2005. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology*. 146: 4211-4216.
- Wadsworth ME, Cripps HA, Midwinter RE, Colley JR. 1985. Blood pressure in a national birth cohort at the age of 36 related to social and familial factors, smoking, and body mass. *Br Med J*. 291: 1534-1538.
- Waterland RA, Garza C. 1999. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr*. 69: 179-197.
- Waterland RA, Garza C. 2002. Early postnatal nutrition determines adult pancreatic glucose-responsive insulin secretion and islet gene expression in rats. *J Nutr*. 132: 357-364.
- Waterland RA, Michels KB. 2007. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu Rev Nutr*. 27: 363-388.
- Wells JC. 2003. The thrifty phenotype hypothesis: thrifty offspring or thrifty mother? *J Theor Biol*. 221: 143-161.
- Westerterp-Plantenga Margriet S, Fredrix Elisabeth WHM, Steffens Anton B. 1994. Food intake and energy expenditure. CRC Press. U.S.A. p408.
- Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH. 2001. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav*. 74: 683-701.
- Winick M, Fish I, Rosso P. 1968. Cellular recovery in rat tissues after a brief period of neonatal malnutrition. *J Nutr*. 95: 623-626.
- Wlodek ME, Westcott K, Siebel AL, Owens JA, Moritz KM. 2008. Growth restriction before or after birth reduces nephron number and increases blood pressure in male rats. *Kidney Int*. 74: 187-195.
- Yajnik CS. 2001. The insulin resistance epidemic in India: fetal origins, later lifestyle, or both? *Nutr Rev*. 59: 1-9.
- Yajnik CS. 2002. The lifecycle effects of nutrition and body size on adult adiposity, diabetes and cardiovascular disease. *Obes Rev*. 3: 217-224.
- Yajnik CS. 2004. Early life origins of insulin resistance and type 2 diabetes in India and other Asian countries. *J Nutr*. 134: 205-210.
- Yajnik CS, Deshmukh US. 2008. Maternal nutrition, intrauterine programming and consequential risk in the offspring. *Rev Endocr Metab Disord*. 9: 203-211.
- Yang L, Scott KA, Hyun J, Tamashiro KL, Tray N, Moran TH, Bi S. 2009. Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance. *J Neurosci*. 29: 179-90.

12. PUBLICACIONES

Miñana-Solis MC and Escobar C. Increased susceptibility to metabolic alterations in young adult females exposed to early malnutrition. *International Journal of Biological Science*. Oct; 3(1):12-19, 2007.

Escobar C, **Miñana-Solis MC**, Buijs RM. Malnutrition after weaning affects rat's metabolism in a permanent manner. *International Journal of Obesity* 31: S78-S105 Suppl. 1 may 2007.

Escobar C. Martínez-Merlos MT, Angeles-Castellanos M, **Miñana MC** and Buijs RM. Unpredictable feeding schedules unmask a system for daily resetting of behavioural and metabolic food entrainment. *European Journal of Neuroscience*. 26: 2804-2814, 2007.

Morgado E, Gordon MK, **Miñana-Solis MC**, Meza E, Levine S, Escobar C and Caba M. Hormonal and metabolic rhythms associated with the daily schedule nursing in rabbit pups. *American Journal of Regulative Integrative and Comparative Physiology*. 295: R690-R695, 2008.

Miñana-Solis MC, Escobar C. Post-weaning protein malnutrition in the rat produces short and long term metabolic impairment, in contrast to earlier and later periods. *International Journal of Biological Science*. Nov; 4(6):422-432, 2008.

Miñana-Solis MC, Angeles-Castellanos M, Feillet C, Pévet P, Challet E and Escobar C. Differential effects of a restricted feeding schedule on clock-gene expression in the hypothalamus of the rat. *Chronobiology International*. 26(5): 808-820, 2009.

Miñana-Solis MC, Angeles-Castellanos M, Ruud Buijs and Escobar C. Altered Fos immunoreactivity in the hypothalamus after glucose administration in pre and post-weaning malnourished rats. *Nutritional Neuroscience*. In press.

Miñana-Solis MC and Escobar C. Early and post-weaning malnutrition impairs α -MSH expression in the hypothalamus: A possible link to long-term overweight. *Nutritional Neuroscience*. Sent.

Agradecimientos personales

A los miembros del jurado agradezco profundamente la paciencia, comentarios, sugerencias y el tiempo dedicado a la revisión de este manuscrito. Sin ustedes no hubiera sido posible el mejoramiento: Dra. Marcia Kiziat Urdanivia, Dr. Manuel Salas Alvarado, Dra. Cristina Revilla Monsalve, Dra. Guadalupe Baños de Macarthy, Dra. Carolina Escobar Briones.

A los miembros de mi comité tutorial integrado por la Dra. Carolina Escobar, Dr. Mauricio Díaz Muñoz y el Dr. Radú Racotta, por todos sus comentarios y por compartir sus conocimientos y tiempo para mi crecimiento y formación académica.

A mis compañeros de laboratorio: **Dra. Tere**, gracias por comenzar este camino conmigo, fue grandioso, tu alegría y sonrisa se quedaron grabadas. Tere, te extrañé tanto... pero fue el nido de una gran amistad y complicidad... **TE QUERO MUCHISSIMO DRA.**

Jorge, **Dr. Mendoza**, gracias por tu apoyo, por escuchar, por las grandes discusiones filosóficas (buenísimas... las extraño), por tu apoyo en tierras lejanas, por ser un **GRAN** científico, Dr. Arrogancia. Gracias.

Tere Merlos, gracias por el poco tiempo que compartimos, durante el cual aprendí mucho de ti... gracias por tu ayuda.

Dra. Carolina, por las grandes oportunidades y enseñarme tantas cosas que guiarán mi camino en la vida y la ciencia; **Dr. Ruud Buijs**, por enseñarme otra forma de hacer ciencia; **Manuel**, por mostrarme el valor del trabajo de los demás, **Katia**, **Roberto**, **Daniela** y **Guadalupe** (gracias por estar ahí, jeso no se olvida!), **Mara**, **Maricarmen**, fue grandioso y de gran aprendizaje compartir un espacio con ustedes, gracias.

Mi mas grande agradecimiento a la **Dra. Vidal**, **Esita**, **Angelica**, **Lorena**, **Zenaida**; Fueron parte importante de todo este trabajo y siempre estuvieron ahí para hacer a un lado las piedras del camino.

Merci aux **Dr. Etienne Challet**, **Dr. Paul Péret**, **Dra. Mirelle Péret**, pour l'opportunité de connaître et de travailler dans votre laboratoire. Pour m'enseigner la

signification d' être *Dr.* Et pour m'enseigner l'amour pour la science. Je remercie a toutes les personnes qui ont fait très agréable mon séjour à la belle ville de Strasbourg. Merci de votre hospitalité, je ne vous oublier pas, ai je vous porter ai dans mon cœur: *Etienne, Sibie, Vincent, Camille*, (merci pour partager votre foyer, votre enfance, votre exquisite nourriture, votre française, et votre gaieté); *Françoise*, (pour m'écouter, pour vos conseils, pour votre délicieuses confitures et pour surtout être un grand d'êtres humain); *Domitille et Jorge* (merci de partager avec moi votre foyer et votre crepers); *Celine et Michel* (merci de votre hospitalité et pour les bons moments); *Laurent* (pour la musique, la compagnie et ton aide); *Marc Cuesta* (pour ton aide et ton patience); *Valerie, Dominique, André Malain*, et toutes les personnes qui conforment cet grand laboratoire... Je n'ai pas de mots pour vous remercier pou toute aide, votre patience et votre compréhension.

A *Francisco Javier Monter Velázquez*, por compartir tu gran arte conmigo y darle vida a la portada de esta tesis. Gracias amigo.

A *Laura*, porque a pesar del tiempo, la distancia y la enfermedad, sigues dandome grandes lecciones de vida que solo se dan y se reciben gracias al amor Te quiero tanto mi gran sol....

A mi queridísimo *Javier (Ratón Vaquero)* que sería de mí sin tus consejos de vida y en lo académico. Eres y serás siempre mi *AMIGO* invaluable, gracias por escuchar y resolver... y por caminar a mi lado todos estos años... ¡y los que nos esperan!

Luis Felipe, por distraer mi vida con lugares hermosos llenos de "biología", por escuchar y por tus palabras de aliento cuando me sentí caer...

Elsita, por los grandiosos momentos que hemos vivido y bailao... Por siempre escuchar, por tus consejos y por respetar y entender el concepto de "espacio"...

A todos y cada uno de mis amigos y compañeros de vida que han gozado y sufrido todo este tiempo conmigo: *Lencho, Cinthia, Gaby, Alfonso* (por esas salvadas), a mi niña *Melissa* (por tu compañía y amor) mi *GRAN* maestro *Palomino* (le agradezco tanto...).

A la fundación ADA, al Lic. Jiménez, Lety, Maricela, Nidia, por seguir confiando en mí y por la gran oportunidad de formar parte de ese sueño. ¡Misión cumplida!

A mi familia, Madrina-Tony, Tía Nena, Tíos Merino-Espínola y mis primos, Tía Margarita, por que sin ustedes en mi vida, no sería Mary Carmen, los quiero a todos.

A mis GRANDES PADRES Vicente y Carmina, por haberme dado la gran oportunidad de vivir y crecer en un mundo lleno de sueños, alegrías y de amor, por enseñarme el camino y fomentar en mí valores y respeto hacia mi trabajo y hacia los demás. No tengo palabras para agradecerles tanto. Mi promesa aún no termina pero este paso es de ustedes. Papito, sigo volando y te extraño muchísimo. . . A J.O., por ser mi hermano, te extraño, sin ti mi vida no había sido tan divertida...

Gracias a todos y cada uno de los valiosos seres humanos que han pasado por mi vida y que me enseñaron lo que a continuación resumo:

“Si un día tienes que elegir entre el mundo y el amor,
Recuerda:
Si eliges el mundo quedarás sin amor,
Pero si eliges el amor, con él conquistarás al mundo”

Albert Einstein