

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE AGRONOMIA

LEPTINA: ROL EN LA SUB-NUTRICION ENERGETICA DE LAS MADRES
GESTANTES Y SUS CONSECUENCIAS EN LOS CORDEROS MACHOS

Por

Ana Laura ASTESSIANO
Eleonora BIANCHI

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2004

Tesis aprobada por:

Dra. Raquel Pérez Clariget

Dra. Mariel Regueiro

Dr. Alvaro López

Fecha:

Autor:

Ana L. Astessiano Dickson

Eleonora Bianchi de Castro

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a todas aquellas personas que de una ú otra forma nos acompañaron en la realización de este trabajo y en la finalización de nuestra carrera.

Dra. Raquel Pérez Clariget.

Dra. Mariel Regueiro.

Dr. Alvaro López.

Ing. Agr. Juan Burgueño.

Dra. Georget Banchemo.

Personal de Biblioteca, Bedelía y Microscopía.

Y en especial, a nuestras familias por su incondicional apoyo en un momento tan importante.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PAGINA DE APROBACION.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
TABLA DE CONTENIDOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y GRAFICOS.....	IV
1. <u>INTRODUCCION</u>	1
2. <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	5
2.1 ANTECEDENTES.....	6
2.2 EL GEN OB.....	6
2.3 LEPTINA.....	8
2.3.1 Estructura Química.....	8
2.3.2 Tejidos Productores.....	9
2.3.3 Receptores.....	10
2.3.3.1 Estructura.....	10
2.3.3.2 Funciones.....	12
2.3.3.3 Localización.....	13
2.3.4 Forma y control de la secreción.....	14
2.3.4.1 Factores reguladores de la secreción.....	15
2.3.5 Acción Biológica.....	17
2.3.6 Mecanismos de Acción.....	22
2.4 IGF-1.....	24
2.5 INSULINA.....	28
3. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	32
3.1 LOCALIZACION.....	32
3.2 ANIMALES.....	32
3.3 TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	33
3.4 ANALISIS DE HORMONAS Y METABOLITOS.....	35
3.4.1 Glucosa.....	35
3.4.2 Insulina.....	35
3.4.3 GF-1.....	36
3.4.4 Leptina.....	36
3.5 ANALISIS ESTADISTICO.....	36
4. <u>RESULTADOS</u>	38

4.1 VARIABLES MORFOLOGICAS.....	38
4.1.1 Peso de las Madres.....	38
4.1.2 Condición Corporal de las Madres.....	39
4.1.3 Peso de la Placenta.....	40
4.1.4 Peso de los Corderos.....	40
4.1.5 Pesos de Hígados y Riñones de Corderos.....	41
4.2 VARIABLES METABOLICAS Y ENDOCRINAS.....	42
4.2.1 Leptina.....	42
4.2.2 Insulina e IGF-1.....	43
4.2.3 Glucosa.....	45
5. <u>DISCUSION</u>	47
6. CONCLUSIONES.....	54
7. RESUMEN.....	55
8. SUMMARY.....	56
9. BIBLIOGRAFIA.....	57

LISTA DE CUADROS Y GRAFICOS:

CUADRO N°:

1. Peso (Kg) de los corderos (al nacer y a 48hs), peso de la placenta (gr) y eficiencia de la placenta (peso placenta/peso nacimiento, gr) de corderos Merino cuyas madres fueron alimentadas con 110% (n=12) o 70% (n=13) de sus requerimientos de Energía Metabolizable (EM) ($x \pm e.e.m.$).....41
2. Peso del hígado y peso de riñones (gr) a las 48 horas de corderos nacidos de madres alimentadas con 70% o 110% de sus requerimientos de energía metabolizable (EM) desde la 10ma semana de gestación hasta el parto($x \pm e.e.m$, gr)..... 41
3. Concentración de leptina (ng/mL) al nacimiento y a las 48 horas de corderos nacidos de madres alimentadas con 110% o 70% de sus requerimientos de EM ($x \pm e.e.m.$).....43
4. Concentración de insulina y de IGF-1 ($x \pm e.e.m$, $\mu\text{UI/ml}$, ng/ml) de corderos Merino cuyas madres fueron alimentadas con 70% o 110% de sus requerimientos de EM a las 48 horas de nacidos.....45
5. Concentración de glucosa ($x \pm e.e.m$, m mol/L) de corderos Merino cuyas madres fueron alimentadas con 70% y 110% de sus requerimientos de EM al momento del nacimiento y a las 48 horas de nacidos.....46

GRAFICA N°:

1. Evolución del peso vivo (media \pm e.e.m.) en ovejas preñadas alimentadas con 70% EM [(□), n=13]; o 110% EM [(■), n=12] de sus requerimientos de energía metabolizable desde la semana 11 previa al parto. * P<0,05.....39
2. Evolución de la condición corporal (media \pm e.e.m.) en ovejas preñadas alimentadas con 70% EM [(□), n=13]; o 110% EM [(■), n=12] de sus requerimientos de energía metabolizable desde la semana 11 previa al parto.....40
3. Evolución de las concentraciones de leptina (media \pm e.e.m.) en ovejas preñadas alimentadas con 70% EM [(□), n=13]; o 110% EM [(■), n=12] de sus requerimientos de energía metabolizable desde la semana 11 previa al parto.....42
4. Evolución de las concentraciones de insulina (media \pm e.e.m) en ovejas preñadas alimentadas con 110% (■) o 70% (□) de sus requerimientos de EM desde la semana 11 previa al parto.....43
5. Evolución de las concentraciones de IGF-1 (media \pm e.e.m) en ovejas preñadas alimentadas con 110% (■) o 70% (□) de sus requerimientos de EM desde la semana 11 previa al parto.....44
6. A: Evolución de la concentración de glucosa en madres que reciben 70% o 110% de los requerimientos de EM desde la 11va semana previa al parto hasta el momento del parto. B: Los mismos animales sin la semana del parto.....45

1. INTRODUCCIÓN.

Los efectos de la nutrición durante la gestación sobre el desarrollo y crecimiento del feto dependen en gran medida del momento considerado del período de gestación.

Al inicio de la gestación, el crecimiento del feto es muy lento y sus necesidades nutritivas son extremadamente bajas. En general se admite que durante el primer mes de gestación, solo niveles de alimentación extremos, es decir, excesivamente elevados o demasiado severos, pueden disminuir la supervivencia embrionaria o retrasar el crecimiento de los fetos

Durante el segundo y tercer mes de gestación se produce un rápido crecimiento de la placenta, mientras que el crecimiento del feto sigue siendo muy pequeño, alcanzando en este momento el 15% de su peso al nacimiento (Robinson, 1982). Un nivel de alimentación reducido en este período puede afectar al desarrollo placentario o indirectamente al peso de los fetos, especialmente en ovejas con condición corporal baja en la encarnerada y en corderas de recría gestantes.

Durante el último tercio de la gestación el crecimiento del feto es más rápido, su peso asciende a un 85% del peso al nacimiento (Robinson *et al.*, 1977). Las necesidades nutritivas aumentan considerablemente como consecuencia del crecimiento y desarrollo del útero grávido (feto, anexos fetales y útero), desarrollo mamario y aumentos en la producción de calor que se producen en un animal gestante. En esta etapa de la gestación, la alimentación materna ejerce una gran influencia sobre el desarrollo del feto y por lo tanto, sobre el peso de los corderos al nacimiento.

La concentración de glucosa sanguínea en ovejas (reservas de glucosa materna), durante el último tercio de la gestación es el factor más importante para conseguir un óptimo desarrollo del feto y evitar la aparición de toxemia de la gestación.

Al final de la gestación, una subalimentación disminuye el flujo sanguíneo al útero, la concentración fetal de insulina e IGF-1, y perjudica el crecimiento y desarrollo del producto. Estos eventos traen consecuencias a corto y largo plazo. Se destaca que los corderos que nacen con peso reducido tienen peor

índice de supervivencia que los corderos que nacen con un peso adecuado provocando un aumento en la mortalidad neonatal. (Jimeno *et al.*, 1997).

Conviene recordar, en primer lugar, que el crecimiento fetal aparece condicionado por el tamaño de la placenta, hecho evidente a la vista de las principales funciones de la misma. Por un lado, la función de la placenta es afianzar el intercambio de nutrientes maternos y de metabolitos fetales en la circulación sanguínea materno-fetal, y por otro, la síntesis y secreción de hormonas entre las que destaca el lactógeno placentario, encargado de las adaptaciones metabólicas en los tejidos maternos que aseguran la llegada de nutrientes a los fetos (Bell, 1999).

Desde el punto de vista del crecimiento fetal las necesidades alimenticias durante la gestación media no son especialmente altas, bastando con que las ovejas reciban el equivalente a las necesidades de mantenimiento o permitiendo incluso ligeras pérdidas de peso corporal (hasta un 5%) sin que ello ocasione ningún perjuicio en cuanto al tamaño de la placenta o de los fetos, siempre y cuando estemos hablando de ovejas que o bien han afrontado la encarnerada en buena condición corporal, o bien pueden compensar dichas pérdidas de peso disponiendo del pertinente nivel de alimentación durante la fase final de la gestación.

Por otro lado, sub alimentaciones severas que alrededor del día 90 de la gestación elevan las pérdidas de peso del 5% al 10%, pueden originar reducciones del tamaño de la placenta y del feto de hasta un 30% y un 10% respectivamente, reducciones que difícilmente pueden ser compensadas incluso elevando el nivel de alimentación al final de la gestación (Robinson, 1982).

Sin embargo, resultados recientes ponen en discusión los efectos de la sub nutrición materna en estadios tempranos de la gestación, y abren un cuestionamiento a los viejos paradigmas y las recomendaciones que de ellos se desprenden.

Es así, que los últimos años se ha demostrado la importancia de la alimentación materna en la etapa intrauterina de los individuos, la que provoca cambios en la programación fetal. El concepto de programación fetal, concepto reciente, fue desarrollado originalmente para explicar variaciones en la

susceptibilidad a enfermedades en humanos (Engelbregt *et al.*, 2000), pero el uso de especies animales como modelo experimental (una de las más utilizadas es *ovis aries*) ha llevado a ampliar los conocimientos en el campo de la producción animal. Barker *et al.*, (1995), denominó programación fetal a esas alteraciones permanentes de procesos de desarrollo y homeostasis.

El crecimiento y desarrollo fetal son dependientes del ambiente nutricional, hormonal y metabólico que le provee la madre. Sus efectos durante la vida prenatal y postnatal temprana puede tener una profunda y persistente influencia sobre los resultados relacionados a la composición corporal, función neuroendocrina, y tolerancia a glucosa. Cualquier disturbio en esos ambientes puede modificar el desarrollo temprano del feto, llevando a enfermedades en la vida adulta. Algunos de esos cambios en etapas tempranas pueden producir patologías serias en humanos. (Holmang *et al.*, 2001; Barker, 1995; Robinson *et al.*, 1999; Symonds *et al.*, 2001)

En ovinos se ha observado que la sub alimentación durante la vida intra-uterina disminuye el desarrollo y número de los folículos de la piel y por lo tanto afecta la producción y calidad de lana en los adultos (Kelly *et al.*, 1992). También se ve afectada la formación del músculo esquelético y por lo tanto la producción y calidad de carne pueden verse comprometidas (Greenwood *et al.*, 1998). También la sub nutrición materna influye en la capacidad reproductiva de su descendencia. Rae *et al.* (2001) observaron una disminución del peso de los ovarios y un menor número de folículos en corderas hijas de madres sub-alimentadas, mientras que Bielli *et al.* (2002) observaron una disminución del número de células de Sertoli en corderos nacidos de madres sometidas a restricción energética.

Si bien son conocidos los efectos detrimentales de la sub-alimentación de las madres gestantes sobre el desarrollo fetal, los mecanismos y señales involucrados en ese proceso siguen siendo tema de investigación y de generación de hipótesis. Recientemente, a las hormonas metabólicas como la Insulina, IGF1, y hormona de crecimiento, se añadió la hormona leptina, descubierta hace menos de 10 años y sintetizada por los adipositos. Este descubrimiento ha generado grandes expectativas ya que por primera vez se conoce que los adipositos, no solo son capatadores de señales sino que ellos mismas sintetizan una señal, concretamente una hormona proteica, y que informa del estado de las reservas corporales al Sistema Nervioso Central (Carrascosa, 2003).

Los objetivos del presente trabajo fueron realizar una revisión bibliográfica sobre la hormona leptina que sirviera como base para una publicación docente, e investigar los efectos de la subnutrición energética a partir de la mitad de la gestación de ovejas Merino sobre las características morfológicas y metabólicas de sus crías al nacer y a las 48 horas de vida, priorizando el posible rol de las concentraciones de leptina.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA.

En los últimos años se ha ido descubriendo que diversas hormonas y factores controlan el consumo voluntario y el peso corporal.

Por ello, hoy podemos hablar de la existencia de sustancias hormonales, con carácter *anorexigénico*, es decir, favorecedoras de la pérdida del apetito y de la pérdida de peso, tales como la *leptina*, CRH (hormona liberadora de corticotropina), CART (Transcrito regulado por cocaína-anfetamina), urocortina, péptido 1 tipo glucagón, oxitocina, neurotensina y melanocortinas (MCH), como la hormona estimulante de melanocitos (alfa-MSH).

Por el contrario, otras hormonas o péptidos *orexigénicos* estimulan el apetito y el incremento de peso como la grelina, neuropeptido Y (NPY), orexinas A y B, hipocretina 1 y 2 o galanina. También son reguladoras otras sustancias como las proteínas desacopladoras (UCP), la bombesina (BN) e insulina.

La expectativa despertada por el descubrimiento de la hormona leptina, descubierta por Friedman *et al.*, en 1994, de la Universidad de Rockefeller, fue muy grande ya que esta hormona es sintetizada en el tejido graso y actúa en el hipotálamo disminuyendo el apetito.

Durante la vida adulta, las concentraciones de leptina y la abundancia de leptina ARNm en el tejido adiposo se correlacionan positivamente con el peso corporal y la adiposidad, y esas concentraciones son alteradas a largo plazo por cambios en el consumo de alimento en roedores, humanos y ovejas. (Maffei *et al.*, 1995; Kolaczynski *et al.*, 1996; Moinat *et al.*, 1995; Bocquier *et al.*, 1998; Delavaud *et al.*, 2000; Trayhurn *et al.*, 1995)

La mayor fuente de información sobre leptina ha sido desarrollada utilizando como modelo roedores (rata y ratón) y humanos. Fue recién en 1998 que Ji *et al* clonaron parcialmente el gen leptina en rumiantes.

2.1 ANTECEDENTES

Hace más de cuatro décadas, Kennedy (1953) propuso la existencia de un mecanismo de regulación de la grasa corporal por medio de una señal producida por los mismos adipocitos.

En 1978 los estudios de Coleman y casi diez años más tarde de Hervey y colaboradores, detectaron la presencia de un factor circulante que regulaba la magnitud de los depósitos corporales de grasa y el balance energético.

En diciembre de 1994, el equipo de Friedman y colaboradores, investigador de Hughes en la Universidad Rockefeller, en Nueva York, clonó exitosamente el gen OB (obesidad) en el ratón y su homólogo humano e identificó su producto proteico: la hormona leptina. Este descubrimiento constituyó uno de los más importantes avances en la investigación de la fisiopatología de la obesidad

En 1995, Tartaglia y col publican sus resultados sobre los estudios de los receptores de leptina. A partir de ese momento las publicaciones sobre la hormona leptina se han ido multiplicando en la literatura internaciona.

El nombre de leptina deriva de la raíz griega “leptos” que significa delgado (Halaas *et al.*, 1995), lo que se debe a su evidente función en el control del peso corporal a través de la regulación del apetito y la termogénesis. En condiciones normales cuando se produce un aumento de grasa en el organismo, la leptina actúa sobre el hipotálamo para disminuir el apetito y aumentar el metabolismo basal. En las personas obesas aumenta la secreción de leptina llegando a alcanzarse valores cuatro veces mayores que en los no obesos, lo cual refleja un estado de resistencia a la leptina (Tierney, 2000).

2.2 EL GEN OB.

Friedman y colaboradores, en 1986 comenzaron con el estudio de la obesidad, y el modelo que eligieron fue el ratón.

Los ratones *ob* (*obese*) y los ratones *db* (*diabetes*) pesan tres veces más de lo que pesa un ratón normal y acumulan cinco veces más cantidad de grasas

en el cuerpo que lo normal. Durante casi ocho años de complicada experimentación genética, Friedman y sus colegas proporcionaron la primera idea sobre el sistema biológico que controla el consumo de alimento y el metabolismo de grasas, y demostraron que los ratones *ob* y *db* reflejan dos aspectos del mismo sistema biológico.

Estos autores han identificado, aislado y clonado el gen *ob* en ratones, es decir, el gen cuya mutación es responsable de la obesidad severa hereditaria de esos animales. El gen se encuentra en un segmento de 650 kilobases del cromosoma 6 de los ratones, y posee la información para codificar la síntesis de una proteína de 167 aminoácidos, que se ha comprobado se expresa (se sintetiza) precisamente en el tejido adiposo. A partir de este momento se hizo evidente la existencia de la hipotética hormona de la saciedad (Hamann y Matthaei, 1996)

Los ratones *ob* engordaban porque carecen de un solo gen: el gen *ob*. Este gen, que normalmente está activo en las células adiposas, produce una proteína que a través de la circulación sanguínea llega hasta el cerebro provocando la saciedad. Friedman llamó al producto del gen faltante *leptina*.

Los ratones *db* carecen de un gen que contiene las instrucciones para producir el receptor de la leptina -antena bioquímica que recibe la señal de la leptina proveniente de las células adiposas-. Es decir, el cerebro de los ratones *db* no puede recibir el mensaje enviado por las células adiposas de reducir el consumo de alimento.

Por otra parte, aunque la biología del sistema es extremadamente compleja y aún queda mucho por dilucidar, hoy podemos decir que la leptina parece desempeñar un papel crítico en la biología cotidiana. Cuando el volumen de grasa disminuye el nivel de leptina cae, aumentando el deseo de comer. Luego de ingerir gran cantidad de alimento, el nivel de leptina aumenta, originando una señal para disminuir la ingesta. Además de modular el consumo de comida y de gasto energético, la leptina afecta también la fertilidad, el mantenimiento de la temperatura y el metabolismo de grasas y de glucosa.

Sin duda, uno de los aspectos más interesantes de la investigación desarrollada por Friedman y colaboradores fue el descubrimiento de un gen humano que se corresponde al gen de la leptina del ratón.

Los datos preliminares evidencian que en los humanos ese gen también existe y que presenta una homología del 84% al del ratón y 83% al de la rata, lo que hizo sospechar que la obesidad humana podía deberse a la ausencia de la hormona de la saciedad, como había sido demostrado en ratones.

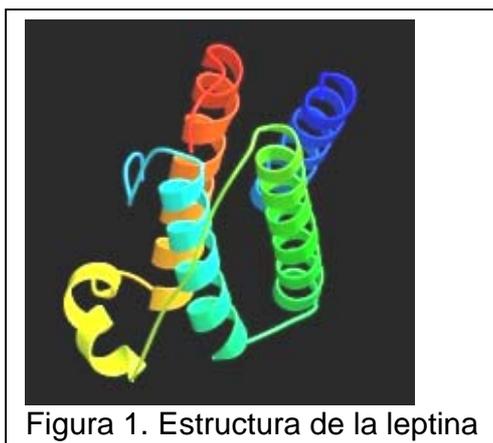
2.3 LEPTINA

2.3.1 ESTRUCTURA QUÍMICA

La leptina es una hormona proteica formada por 167 AA (Carrascosa y Yeste, 1999; Maffei *et al.*, 1995; Houseknecht *et al.*, 1998; Hamann y Matthaei, 1996; Zhang *et al.*, 1994). Sin embargo, estudios más recientes identificaron que la leptina es una hormona de 146 aminoácidos producida a partir de un precursor de 167 aminoácidos, con una secuencia señal de 21 aminoácidos que se escinde antes de que la leptina pase a la sangre (Simón y Del Barrio, 2002).

Los primeros 21 aminoácidos del precursor se separan, dando origen a la leptina activa a partir del aminoácido 22 y hasta el 167. (Figura N° 1)

La proteína activa, de 146 aminoácidos, tiene un peso molecular de 16 KD y posee una estructura terciaria similar a la estructura de las citoquinas clásicas de hélice larga, como la interleukina 2. (Madej *et al.*, 1995)



La molécula contiene un enlace disulfuro intercadena, que al parecer es necesario para su actividad biológica. Su estructura es muy similar en las distintas especies,

Es codificada por el gen *ob* y se encuentra en la circulación sanguínea en forma libre y ligada a proteínas ligadoras. Su vida media en suero sanguíneo es de aproximadamente 25 minutos en el caso de la hormona endógena y de 90 minutos para la exógena. Su eliminación se lleva a cabo principalmente por vía renal. (Cumin *et al.*, 1996; Tierney, 2000; Mockus, 2001; Zhang, 1997)

2.3.2 TEJIDOS PRODUCTORES DE LEPTINA

A pesar de que durante los 3 años siguientes a la identificación de la leptina se pensó que sólo se producía en el tejido adiposo, estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, han demostrado que tiene diversos orígenes.

Esta hormona es secretada a la sangre principalmente por el tejido adiposo blanco (Schwartz *et al.*, 1996) y en menor medida por el tejido adiposo marrón (en este último la concentración de ARNm leptina es abundante, siendo aproximadamente el 40% de lo que hay en la grasa blanca), el estómago, las células del hígado, músculo esquelético, células epiteliales de la glándula mamaria y tejido fetal.

También es sintetizada tanto por las células trofoblásticas placentarias como por las del amnios y es secretada a la circulación materna, por lo que su concentración en el plasma se eleva durante la gestación normal, sobre todo en el segundo y tercer trimestres en humanos (Sagawa, 1997; Simón y Del Barrio, 2002; Hamann y Matthaei, 1996; Senaris *et al.*, 1997; Bado *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Smith-Kirwin *et al.*, 1998; Morash *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 1999; Hoggard *et al.*, 1997, 2000; Masuzaki *et al.*, 1997) y en ovejas (Ehrhardt *et al.*, 2001)

La expresión del gen Leptina es relativamente elevada en la placenta humana (Masuzaki *et al.*, 1997) y también se detecta en la placenta de roedores (Hoggard *et al.*, 1997).

Bado *et al.*, (1998) detectaron la producción de leptina en las células de las glándulas fúndicas del estómago, cuya secreción está inhibida por diversos factores como son la ingesta o la administración intraperitoneal de CCK (colecistoquinina) y gastrina, originando un aumento colateral de los niveles plasmáticos.

2.3.3 RECEPTORES

Para poder realizar sus funciones la leptina, como toda hormona, debe unirse a sus receptores específicos, localizados en las membranas de sus células blanco.

También se ha postulado que los receptores de Leptina están involucrados en el transporte unidireccional de la hormona desde la sangre al fluido cerebroespinal. Se especuló que este sistema de transporte utiliza una de las cortas formas de receptor de la leptina para translocarla (Banks *et al.*, 1996) mientras que el receptor funcional pertenece a la forma larga (Simón y Del Barrio 2002).

2.3.3.1 Estructura

El receptor de la leptina (*Ob-R*) es un receptor de membrana, identificado en 1995 por Tartaglia y colaboradores utilizando leptina marcada. Estos investigadores demostraron su existencia en los plexos coroideos del ratón. Posteriormente se identificaron por lo menos 6 isoformas de estos receptores (Chua *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998).

El *Ob-R* consiste en una proteína de membrana homóloga al receptor de la familia de las citoquininas clase 1, incluyendo receptores para el interferón y la hormona del crecimiento. (Carrascosa y Yeste, 1999; Auwerx y Staels, 1998; Houseknecht *et al.*, 1998; Ceddia *et al.*, 1998; Sharma y Considine, 1998; Tartaglia, 1995, 1997)

Existen múltiples formas del receptor, tanto en ratas como en humanos, incluyendo formas cortas (*Ob-Ra*, *Ob-Rc*, *Ob-Rd*, *Ob-Re* y *Ob-Rf*) como largas (*Ob-Rb*) (Bjorbaek *et al.*, 1997; Ghilardi *et al.*, 1996; Vaisse *et al.*, 1996).

El receptor de leptina, esquematizado en la Figura 2, está compuesto por una zona externa receptora de 816 aminoácidos, un dominio transmembrana de 23 aminoácidos y de un dominio intracelular citoplasmático de 34 aminoácidos en la forma corta y, 303 aminoácidos en la forma larga, y es responsable de la activación de las señales intracelulares. (Carrascosa y Yeste, 1999; Tartaglia, 1997; Houseknecht *et al.*, 1998; Remesar *et al.*, 1997; Trayhurn *et al.*, 1998; Bernardis y Bellinger, 1998; Sharma y Considine, 1998)

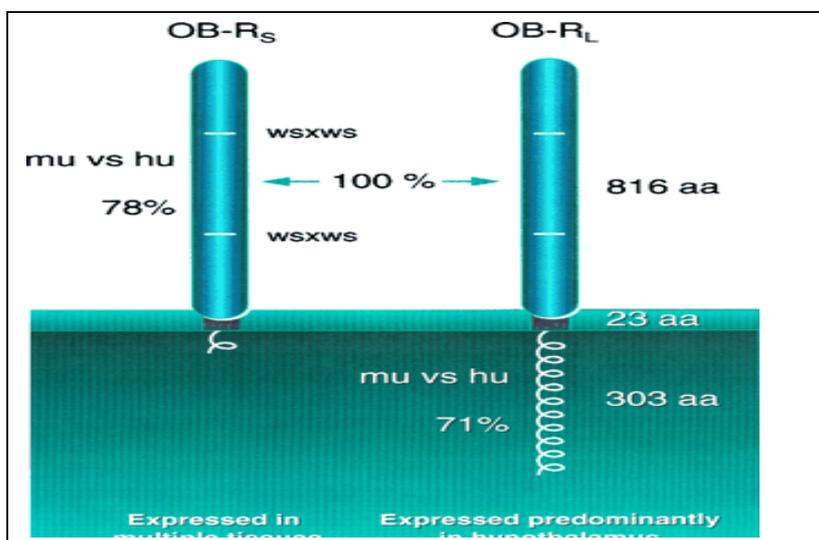


Figura 2. Formas corta y larga del OB-R

La forma corta del receptor (OB-R_S) se expresa en distintos tejidos y la forma larga (OB-R_L) predomina en el hipotálamo. Los dominios extracelulares de ambas formas son

idénticos, así como los dominios transmembrana, radicando la diferencia en los intracelulares. La similitud en la estructura de los receptores humanos y de rata son del 78 % para el dominio extracelular y del 71 % para el intracelular (Tartaglia, 1997).

El lado extracelular del Ob-R (exones 1-15) contiene una región a la que pueden unirse dos moléculas de leptina, aunque no se conoce la estequiometría de unión de la leptina al receptor. El exón 16 codifica el dominio transmembrana del receptor presente en todas las variantes excepto en Ob-Re (forma soluble). La región implicada en la señalización intracelular presenta diferente tamaño. La isoforma Ob-Rb/Ob-RL, de mayor tamaño, posee todos los dominios implicados en la señalización intracelular y es capaz de activar factores de transcripción tipo STATs (Signal Transducer Activator Transcription) a través de la proteína-quinasa JAK (Janus Activated Kinase). En efecto, en el exón 17 se localiza un sitio de unión a JAK capaz de activar a STAT5B. El sitio de interacción con STAT viene codificado por el exón 18b y puede unir a STAT1 y 3. (Houseknecht *et al.*, 1998; Remesar *et al.*, 1997; Trayhurn *et al.*, 1998; Bernardis y Bellinger, 1998; Sharma y Considine, 1998; Bjorbaek *et al.*, 1997; Ghilardi *et al.*, 1996).

Por lo contrario, las formas cortas de los receptores de leptina (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd y Ob-Rf) tienen poca capacidad de activar JAK e incapaces de activar STAT. Por otra lado, el receptor Ob-Re carece de los dominios intracelular y transmembrana y circula como un receptor soluble (Halaas y Friedman, 1997; Friedman y Halaas, 1998).

2.3.3.2 Funciones

Las funciones de los receptores Ob-Rb (forma larga) consisten en mediar las acciones de la leptina a nivel del SNC, mientras que las isoformas cortas (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd y Ob-Rf) se han relacionado con el transporte y depuramiento de la leptina, con la regulación del sistema inmune, etc.

La isoforma Ob-Re podría estar implicada en el transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica, al ser una forma soluble.

La leptina realiza la mayoría de sus efectos metabólicos mediante la interacción con sus receptores específicos localizados en el sistema nervioso central y en tejidos periféricos. Se ha descrito que cuando la leptina se une al receptor *Ob*, éste forma dímeros y transmite la señal de la leptina a través de las proteínas JAK a tres transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT - 3, 5 y 6-) citosólicas. Después del transporte al interior del núcleo se unirán a los elementos sensibles de los STAT y el DNA, estimulando la transcripción de los genes blancos sensibles dentro del genoma de las células blanco. (Auwerx y Staels, 1998; Simón y Del Barrio, 2002)

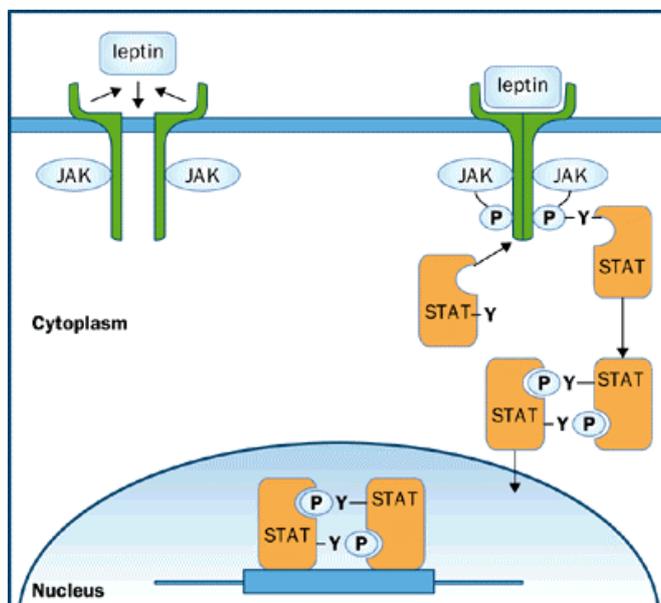


Figura 3. Efecto de la unión de la leptina a su receptor.

2.3.3.3 Localización

Además de la existencia de receptores de leptina en el cerebro, éstos se encuentran en órganos periféricos, lo que amplía su radio de acción más allá de ser un factor circulante de saciedad. En el cerebro, aparte de estar presentes en los plexos coroideos, también se han encontrado en regiones hipotalámicas como el núcleo arcuato, regiones para-ventricular y ventro-medial, que están implicadas en la regulación del balance energético y también en el hipocampo, cerebelo, corteza cerebral y endotelio capilar (Houseknecht *et al.*, 1998; Remesar *et al.*, 1997; Trayhurn *et al.*, 1998; Bernardis y Bellinger, 1998; Sharma y Considine, 1998)

En cuanto a los tejidos periféricos se encuentran en pulmón y riñón (Sharma y Considine, 1998), hígado (Bernardis y Bellinger, 1998), corteza adrenal, útero (Cioffi *et al.*, 1997), ovarios (Kieffer *et al.*, 1996; Cioffi *et al.*, 1996), testículos (Kieffer *et al.*, 1996; Cioffi *et al.*, 1996), músculo esquelético (Bernardis y Bellinger, 1998), células hematopoyéticas, tejido adiposo, islotes pancreáticos y tracto gastrointestinal (Auwerx y Staels, 1998; Simón y Del Barrio, 2002; Trayhurn *et al.*, 1999)

La existencia de receptores de leptina en el páncreas sugiere que esta hormona probablemente regule la liberación de insulina, en otras palabras, puede que exista un mecanismo inverso de regulación entre el páncreas y el tejido adiposo. Recientemente se estableció que la leptina inhibe la secreción de insulina y actúa en contra de la insulina en el hígado y en el tejido adiposo (Bernardis y Bellinger, 1998; Kieffer *et al.*, 1996).

El receptor de leptina ha sido localizado también en los ovarios, testículos y endometrio humanos, lo que sugiere que esos órganos son, en realidad, blancos de acción de la leptina, y lo que lleva a la suposición que la leptina está directamente involucrada en la función reproductiva. (Cioffi *et al.*, 1996, 1997).

La leptina puede ejercer acción inmediata en las funciones de esos órganos reproductivos en los humanos. Está involucrada en la esteroidogénesis en ovarios normales, particularmente durante el periodo post-ovulatorio (Cioffi *et al.*, 1996, 1997). Las células de la capa granular del cumulus oophorus son capaces de tomar y reaccionar con la leptina. Los niveles de esta hormona aumentan significativamente luego del pico de LH en la ovulación o la

administración de gonadotrofina coriónica humana en caso de ovulación inducida. (Cioffi *et al.*, 1997).

2.3.4 FORMA Y CONTROL DE LA SECRECIÓN

La determinación de leptina en el laboratorio puede realizarse por radioinmunoanálisis (RIA) específico o por ensayo inmunoenzimático (ELISA). Para ello, varios laboratorios han desarrollado un RIA para leptina y validado para las especies de su interés.

La secreción de la leptina está sujeta a doble control. Por un lado se observa un nivel basal que no es sensible a la ingesta y que refleja la adiposidad del organismo o la condición corporal. Por otro, la concentración de la hormona es sensible a la ingesta y presenta variación diurna.

El rango de concentración de leptina en plasma en ovejas es de 1 a 9 ng/ml, similar al rango observado en humanos (Considine *et al.*, 1996). La leptina plasmática se correlaciona positivamente con el índice de masa corporal (IMC) y con el porcentaje de grasa total en humanos y animales (Cabrera, 2000; Simón y Del Barrio, 2002).

Sin embargo, existen diferencias entre ovejas y humanos que pueden ser explicadas en parte, por los diferentes patrones de deposición de grasa que ocurren en esas especies durante la vida fetal. En fetos de ovejas, la grasa depositada es de 0,8 gr/Kg de peso corporal fetal por día, la proporción de grasa corporal al término es de 0.3 - 2.0%, y la principal grasa depositada es el tejido adiposo perirenal el cual se forma a partir de las células de grasa marrón (Gemmell y Alexander 1978). Esto determina que el cordero sea un animal magro. En contraste, en los fetos humanos la grasa es depositada a tasas más elevadas (3.5 gr/Kg de peso corporal fetal por día), la proporción de grasa corporal al término es de 16% y la grasa subcutánea depositada es a partir de las células de la grasa blanca (Fowden, 1995).

Estudios en ovejas demostraron que para ambos sexos la concentración de leptina depende del contenido de grasa corporal (Considine *et al.*, 1996). Sin embargo, Blache *et al.* (2000) encontraron que sólo el 30% en las variaciones en la concentración de leptina eran explicadas por el espesor de grasa dorsal,

sugiriendo que otros factores extrínsecos tengan mayor efecto en la secreción de dicha hormona.

También hay que tener en cuenta que entre rumiantes y no rumiantes existen grandes diferencias en los procesos digestivos que determinan diferentes metabolitos disponibles para su absorción en el intestino delgado. Es así que los no rumiantes tienen una glucemia normal de 1gr/L, mientras que los rumiantes este valor es la mitad: 0.5-0.6 gr/L. La fuente de glucosa más importante en los rumiantes proviene de su propia neoglucogénesis hepática. Por todo ello, no debe sorprender que el balance energético y sus forma de control y de comunicación, presenten diferencias entre especies.

Otro factor que determina los valores de leptina es el sexo. Es así que las hembras presentan valores de leptina en sangre más elevados que los machos tanto en ovinos como en humanos (Rosenbaum *et al.*, 1996; Landt *et al.*, 1998).

En lo que no hay discusión es en el hecho de que la expresión del gen de leptina es en parte regulado por la nutrición. Probablemente este efecto esté mediado en parte por la insulina. La expresión de la leptina se incrementa luego de un pico de secreción de insulina durante el consumo (Boden *et al.*, 1996; Kolaczynski *et al.*, 1996; Saladin *et al.*, 1995; Segal *et al.*, 1996). También, se encontró que la insulina estimula directamente la expresión de leptina por los adipocitos (McDougald *et al.*, 1995; Rentsch y Chiesi, 1996) y que los niveles de esta hormona disminuyen en respuesta a deficiencias de insulina e incrementan en respuesta a tratamientos con la misma (McDougald *et al.*, 1995). Otros autores (Ovies, 1999) encontraron que existe una correlación significativa entre los niveles de leptina plasmáticos y los de insulina basal en individuos normales, aunque las interacciones entre estas dos hormonas son complejas existiendo varios aspectos aún por dilucidar.

2.3.4.1 FACTORES REGULADORES DE LA SECRECIÓN.

El regulador más importante de la secreción de leptina es el peso corporal (Robaezyk *et al.*, 1997; Maffei *et al.*, 1995; Houseknecht *et al.*, 1998; Sinha y Caro, 1998; Rosenbaum *et al.*, 1996; Considine, 1997; Haffner *et al.*, 1997; Chehab *et al.*, 1996; Chapman *et al.*, 1997 ; Roury *et al.*, 1997). Sin embargo, la existencia de fluctuaciones en valores de leptina en suero, sugieren que otros factores también están probablemente regulando la secreción de leptina (Sinha y Caro, 1998; Haffner *et al.*, 1997).

Se sabe que la edad a la pubertad y la raza no afectan los niveles de esta hormona. (Castracane *et al.*, 1998; Sinha y Caro, 1998).

En general los niveles de leptina en suero están afectados por factores nutricionales y hormonales. El ayuno hace disminuir la secreción de leptina, (con 24 hrs. de ayuno la leptina disminuye un 30%) y el excesivo consumo incrementa la secreción de leptina, (con 12 hrs. de excesivo consumo la leptina aumenta un 50%). Los niveles de leptina aumentan más con dietas ricas en grasa. (Houseknecht *et al.*, 1998; Trayhurn *et al.*, 1998; Nedvidkova, 1997; Sinha y Caro, 1998; Nicklas *et al.*, 1997; Bernardis y Bellinger, 1998; Pirwany *et al.*, 2001; Conings *et al.*, 2001). En ayuno o tras una restricción calórica, los niveles de leptina en humanos y roedores caen en mayor proporción de lo esperable en función de la disminución de los depósitos grasos (Frederich *et al.*, 1995; Boden *et al.*, 1996; Kolaczynski *et al.*, 1996). Dicha reducción de los niveles de leptina causa un aumento del apetito y una disminución del gasto energético.

En situaciones de restricción energética, la composición de la dieta no modifica los niveles de leptina y, por tanto, la concentración sérica aparece más estrechamente relacionada con otros factores como el porcentaje de grasa corporal o el déficit energético (Simón *et al.*, 1999).

La tasa de crecimiento fetal y el peso corporal al nacimiento están afectados positivamente por la nutrición durante la preñez, Yuen *et al.* (2002) hipotizaron que la síntesis y secreción de leptina podría estar regulada por el suministro de nutrientes al feto.

La insulina, los glucocorticoides y los estrógenos son reguladores positivos de la síntesis de leptina, mientras que las catecolaminas a través de sus receptores beta-adrenérgicos, los andrógenos y los ácidos grasos de cadena larga inhiben su síntesis (Carrascosa y Yeste, 1999; Trayhurn *et al.*, 1998; Nedvidkova, 1997; Halleux *et al.*, 1998; Remesar *et al.*, 1997).

La insulina tiene un efecto contradictorio en la secreción de leptina. A corto plazo, la hiperinsulinemia probablemente no tiene efecto sobre la secreción de leptina, mientras que a largo plazo causa incrementos en los niveles de esta hormona. (Segal *et al.*, 1996; Dagogo-Jack *et al.*, 1996; Withers, 2001; Malmstrom *et al.*, 1996; Utriainen *et al.*, 1996).

La identificación de receptores de estrógenos en el tejido adiposo, hace suponer que ellos están probablemente involucrados en la secreción de leptina. Esta información no fue aceptada por todos los autores, ya que algunos desacreditan el rol de los estrógenos como promotores de la secreción de leptina. (Castracane *et al.*, 1998; Rosenbaum *et al.*, 1996; Haffner *et al.*, 1997).

Los andrógenos disminuyen la secreción de leptina, lo que en parte explica el menor nivel de esta hormona en hombres que en mujeres. (Segal *et al.*, 1996). La administración de andrógenos en hombres hipogonadales reducen los niveles de leptina en suero. (Lakho y Quereshi, 2001).

Hay acuerdo en la literatura sobre la ausencia de un rol de las gonadotropinas en la secreción de leptina. (Roury *et al.*, 1997).

Por lo que a la fecha los moduladores de la síntesis y secreción de leptina incluyen a la insulina, glucocorticoides, consumo de alimentos y el incremento de grasa corporal como estimulantes de la secreción de leptina, mientras que la diabetes, la adenolectomía, la privación de alimento, el ejercicio y la exposición al frío, disminuyen la síntesis y secreción de la misma.

2.3.5 ACCIÓN BIOLÓGICA

La leptina juega un rol muy importante en la regulación del consumo voluntario y el metabolismo, mientras que en el área de la reproducción su rol todavía no está totalmente establecido y varía entre especies. (Hoggard *et al.*, 1998).

La leptina actúa en el SNC a través de un receptor específico, también sirve como señal metabólica de las áreas del cerebro, regulando el apetito y el metabolismo es decir, disminuye el consumo voluntario y aumenta la tasa metabólica general y los niveles de actividad (Haynes *et al.*, 1998; Hamann y Matthaei, 1996; Barash *et al.*, 1996).

En efecto, la leptina secretada por los adipocitos, de acuerdo con las investigaciones más recientes, circula por la sangre, y actúa como una señal nutricional que se dirige al SNC, encargándose de modular los mecanismos

neuroendócrinos que median diversas respuestas adaptativas y de comportamiento (Ahima *et al.*, 1996; Carro *et al.*, 1997; Legradi *et al.*, 1997).

Es así que, la leptina, secretada por los adipocitos u otras células hacia el torrente sanguíneo puede: a) atravesar la barrera hematoencefálica en donde desencadena mecanismos relacionados con la inhibición de la ingesta, la activación del gasto energético, la regulación de diversos procesos metabólicos y funciones neuroendócrinas o b) participar en otras funciones biológicas como la angiogénesis, inmunidad, reproducción, absorción intestinal, entre otras. (Ver figura 4)

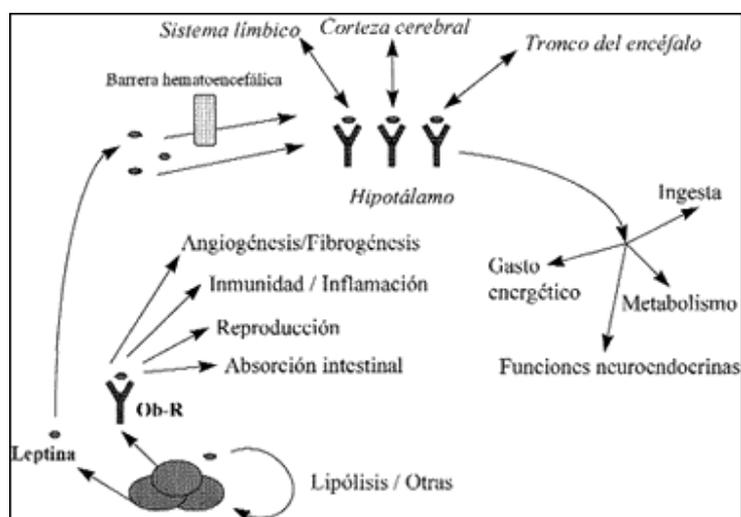


Figura 4. Esquema de las principales acciones centrales y periféricas de la leptina (Modificado de Friedman y Halaas, 1998)

La leptina modifica el metabolismo glucídico. En ratones *ob/ob* el tratamiento con leptina disminuye los niveles de glucosa sin modificar los de insulina y mejora la sensibilidad a la misma, es decir, aumenta la captación de glucosa por los tejidos. En un estudio realizado por Ceddia y colaboradores (1999), concluyeron que en el hígado de rata perfundido *in situ*, la leptina *per se* no afecta de forma directa a la glicólisis hepática o a la producción de glucosa, pero una concentración fisiológica de leptina es capaz de inducir de forma directa una marcada reducción en la producción de glucosa estimulada por glucagón.

También, estimula la lipólisis en el adipocito, manifestando su acción parácrina. La leptina provoca una modificación del reparto lipídico en el tejido muscular, estimula la termogénesis en el tejido adiposo marrón y es capaz de aumentar la síntesis de los ácidos grasos en el hígado. (Simón y Del Barrio, 2002)

Por otra parte, la leptina constituye una señal metabólica fundamental que modula la secreción de la hormona del crecimiento (Carro et al., 1997).

La producción de leptina a nivel de la placenta y del cordón umbilical en humanos, sugiere que podría actuar como un factor de crecimiento o como una señal del estado nutritivo y energético entre la madre y el feto, asegurando un adecuado aporte nutritivo a este último. (Simón y Del Barrio, 2002).

No hay discusión en ninguna de las especies estudiadas hasta ahora, en que la leptina disminuye el consumo voluntario o el apetito, sin embargo los mecanismos involucrados en esa función no están completamente entendidos.

La principal acción de la leptina es ejercida en el hipotálamo, donde inhibe la secreción del neuropéptido Y (NPY) en las neuronas correspondientes (Houseknecht *et al.*, 1998 ; Haynes *et al.*, 1997 ; Rohner-Jeanrenaud y Jeanrenaud, 1997 ; Remesar *et al.*, 1997 ; Trayhurn *et al.*, 1998 ; Thomson *et al.*, 1997 ; Orban *et al.*, 1998 ; Hamann y Matthaei, 1996). En experimentos con animales obesos se identificaron niveles del NPY más altos que en animales normales. (Rohner-Jeanrenaud y Jeanrenaud, 1997).

El NPY pertenece a la familia de polipéptidos pancreáticos. Se expresa en varias regiones del hipotálamo, donde es sintetizado por neuronas específicas, y es considerado uno de los neurotransmisores orexigénico más potente. La leptina al inhibir su síntesis provoca una disminución del apetito.

Desde que el NPY es el estimulante potencial del apetito, un aumento del nivel del mismo en el hipotálamo, causa hiperinsulinemia y aumenta el nivel de glucocorticoides, y aparecen las manifestaciones de la obesidad. (Rohner-Jeanrenaud y Jeanrenaud, 1997; Hamann y Matthaei, 1996)

En ovejas las restricciones alimenticias incrementan el NPY en el hipotálamo (Barker-Gibb y Clarke, 1996). Dosis exógenas de leptina en corderos bien alimentados (dieta de mantenimiento) suprimió el consumo voluntario ($P < 0.001$), mientras que en corderos subalimentados (62% de los requerimientos de mantenimiento) no tuvo ningún efecto ($P > 0.25$). (Morrison *et al.*, 2001; Adam *et al.*, 2003), esto es porque, la adecuada nutrición mantiene elevada la concentración de leptina en sangre.

La leptina, también constituye una señal metabólica del sistema reproductivo reflejando el estado de nutrición y reservas de energía. De hecho actúa como un “adipostant”, señal humoral que lleva información respecto a las reservas de energía y por lo tanto se la ha vinculado a la relación entre la función reproductiva y el balance energético. (Matthew *et al.*, 1999 ; Ilona *et al.*, 1996)

Bajo condiciones de inadecuadas reservas de energía o cuando el sistema metabólico está estresado, los niveles de leptina bajos actúan como una puerta metabólica para inhibir la actividad del eje reproductivo neuroendócrino en ambos sexos. Puede informar al eje reproductivo sobre el estado nutricional del cuerpo, permitiendo la reproducción avanzada si las suficientes reservas metabólicas están disponibles, e interrumpiendo la reproducción si las reservas son bajas (Barash *et al.*, 1996).

No se ha determinado si la leptina activa el eje reproductivo o sirve como una señal permisiva que mantiene la función reproductiva cuando sus niveles circulantes están sobre el umbral. El estrés metabólico por una restricción en la alimentación, o por enfermedades metabólicas o el ejercicio severo, pueden estar informar al sistema reproductivo a través de una concentración baja de leptina, que las condiciones necesarias para una exitosa reproducción no están dadas. (Barash *et al.*, 1996)

Cuando el animal mejora el estado metabólico, los niveles de leptina incrementan, el sistema reproductivo se vuelve activo y se restaura la fertilidad. Sin embargo, el mecanismo por el cual esto es llevado a cabo, no es claro. (Barash *et al.*, 1996)

Thomas *et al.*, (2001) observaron que ovejas sobrealimentadas durante la preñez estaban asociadas a altas concentraciones de leptina cuando se las

comparaba con animales consumiendo dietas control (dieta de mantenimiento). Para comprobar esto, a los animales sobrealimentados se les tomaron muestras de tejido adiposo perirenal en el día 128 de la gestación y efectivamente se observaron altos contenidos de leptina.

Quizás el hecho que desde el principio hizo que se planteara una asociación entre la concentración de la leptina y la fertilidad, provino del propio modelo: el ratón *ob-ob*. Esta disfunción cursa entre otras cosas con infertilidad, la que se restablece luego de administrar leptina exógena. Ratas en laboratorio con insuficiencia en leptina exhiben: obesidad, diabetes tipo II e infertilidad, también tiene un efecto directo en las gónadas. La administración de leptina recombinante causa aumento en la secreción de GnRH y gonadotrofinas, con un retorno a los niveles normales de fertilidad. (Weigle, 1997; Wauters et al., 2001; Orban et al., 1998).

Hay fuertes evidencias que en ratas y humanos las bajas concentraciones de leptina se asocian en retardos de la pubertad. Que la leptina sea la primera señal metabólica para iniciar el comienzo de la pubertad es controversial. Es indiscutible, que los niveles adecuados de leptina en circulación son esenciales (pero no suficientes) para el desarrollo puberal, y que el tratamiento con leptina puede revertir el retraso en alcanzar la maduración sexual causado por la restricción de alimento. (Cheung et al., 1997).

El proceso de la pubertad en vacas está asociado fundamentalmente al peso corporal más que a la edad cronológica. Existe una fuerte asociación entre el peso y la concentración de leptina ($r=0.85$). Los niveles de leptina aumentan linealmente desde 16 semanas antes hasta la semana en que se produce la primera ovulación (García *et al.*, 2002).

El ayuno de 2-3 días no disminuye la pulsatilidad de GnRH en vacas adultas, sin embargo, dos días de ayuno completo produce una disminución de la concentración de leptina y de la pulsatilidad de LH (Williams *et al.*, 2002). Es posible que el rumiante adulto por su propia fisiología digestiva no sea un buen modelo para estudiar los efectos del ayuno, mientras que animales jóvenes si lo sean.

Sin embargo en ovinos la leptina no aparece claramente involucrada en el control de la secreción de LH. Si bien la concentración de leptina aumenta en

dietas que modifican la pulsatilidad de LH (Chagas *et al.*, 1999), Celi *et al* (2000) no observó aumento de la pulsatilidad de la gonadotropina cuando inyectó leptina a varias dosis en el tercer ventrículos de carnero adultos. Tampoco obtuvo respuesta en carneros sometido a dietas sub-energéticas e infusiones de leptina durante 5 días. Estos trabajos, si bien avalan a la leptina como un potente inhibidor del consumo voluntarios en ovinos, plantean dudas sobre el rol de la leptina en la reproducción de esta especie.

La leptina actúa sobre el sistema nervioso autónomo, cardiovascular y uropoyético, y está involucrado en el proceso de hemopoyesis. Sus acciones no están del todo comprendidas, pero se cree que los desordenes de secreción y acción de la leptina podrían estar implicados en los cambios en el sistema simpático, sistema cardiovascular y riñón, y en este caso, en la obesidad. (Haynes *et al.*, 1997,1998; Castagna *et al.*, 1998; Trayhurn *et al.*, 1998)

2.3.6 MECANISMO ACCIÓN

La leptina, producto del gen Ob, es secretada por el tejido adiposo, atraviesa la barrera hematoencefálica y funciona como una señal aferente al ligarse al receptor hipotalámico Ob-R, desencadenando una disminución en la ingesta calórica y el incremento en la actividad del SNS, lo que lleva al aumento del metabolismo basal y del gasto energético. (Mockus, 2001)

Los efectos de la leptina en el hipotálamo están mediados, al menos en parte, por una disminución en la expresión y secreción del neuropéptido Y (NPY), que es el más potente agente *orexígeno* conocido y por un efecto antagonista sobre el receptor del mismo. Además, la leptina provoca un incremento de la secreción de la hormona liberadora de la corticotropina (CRH), de la urocortina y de la hormona estimuladora de los melanocitos (MSH), que tienen un efecto de inhibición sobre la ingesta. Esto es, la leptina puede estimular la acción de diversos agentes anorexígenos a la vez que antagoniza el efecto orexígeno de otros (figura 5). (Mockus, 2001; Pisabarro, 1999; Bray, 1996.)

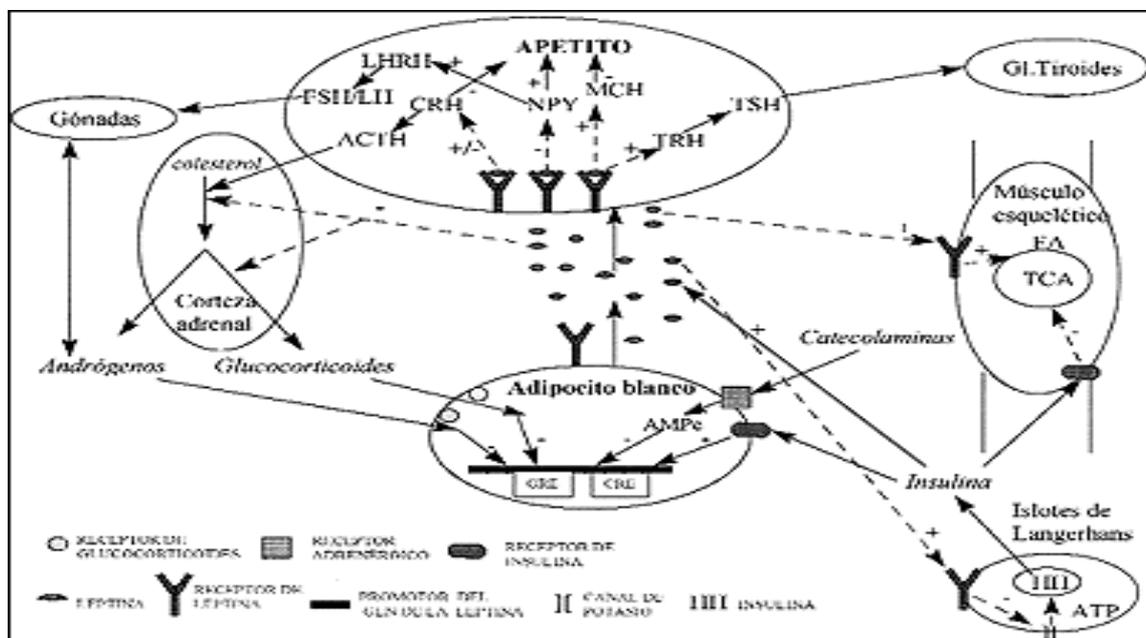


Figura 5. Señalización por leptina desde el adipocito blanco hasta el cerebro para el control del apetito. Interacciones con el sistema endocrino.

La leptina actúa sobre los receptores hipotalámicos y estimula la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), dando inicio a la liberación de las gonadotropinas hipofisarias FSH y LH, las que estimulan la secreción de los esteroides gonadales que conducen al desarrollo del aparato reproductor y la inducción de la pubertad. (Carrascosa y Yeste, 1999). Sin embargo como fue discutido en el punto anterior, este efecto de la leptina ha sido puesto en duda al menos en los ovinos.

Asimismo, tiene efectos sobre otros órganos endócrinos como la glándula tiroidea, el páncreas, glándula suprarrenal y las gónadas, que explican su diversidad de funciones.

2.4 IGF-1

El factor de crecimiento insulínico tipo 1 es un polipéptido de 70 aminoácidos, que forma parte de un grupo de factores de crecimiento parecidos a la insulina. La molécula presenta aproximadamente un 50 % de similitud en la secuencia de aminoácidos con la pro- insulina, y tiene un número de funciones biológicas similares a las de la insulina. Aunque el péptido presenta una elevada dependencia de la hormona de crecimiento (GH), un número cada vez mayor de estudios informan de una secreción independiente de la GH.

El sistema IGF esta formado por las hormonas IGF-1 e IGF-2, sus receptores y sus proteínas transportadoras (IGFBPs). La hormona IGF-1 circula en plasma unida a proteínas específicas de transporte, identificadas hasta el momento actual seis tipos, y cuantificadas en suero fetal los tipos 1,2, y 3 (Lasarre *et al.*, 1991; Giuidice *et al.*, 1995).

En la etapa extrauterina, en humanos la IGF-1, es sintetizada y secretada fundamentalmente por el hígado en respuesta a señales de la hormona del crecimiento (GH), y en menor medida por otros tejidos. Sin embargo, durante el desarrollo fetal prácticamente todos los tejidos tienen la capacidad de sintetizar IGF-1 y sus proteínas de transporte (Baker *et al.*, 1993; Kaye *et al.*, 1992; LeRoith *et al.*, 1995; 1988; Powell-Baxtron *et al.*, 1993; Bondy *et al.*, 1990; Lasarre *et al.*, 1991; Carrascosa y Audi, 1993; Oliver *et al.*, 1993; Nonoshita *et al.*, 1994; ; Adamson, 1993; Giuidice *et al.*, 1995; Gluckman, 1995; Guevara-Aguirre, 1996; Fukushima *et al.*, 2002; Holt, 2002). . Durante esa etapa, los principales órganos sintetizadores del IGF-1 son la placenta, el corazón, el pulmón, el riñón, el hígado, el páncreas, el bazo, el intestino delgado, los testículos, los ovarios, el intestino grueso, el cerebro, la médula ósea y la hipófisis.

La hormona IGF-1 tiene receptores específicos en múltiples tejidos fetales, donde actúan por un mecanismo autócrino/parácrino regulando la multiplicación y diferenciación celular. La expresión del receptor tipo 1, para el que IGF-1 presenta mayor afinidad, es esencial para la aparición de los efectos promotores del crecimiento y ya se expresa tan tempranamente como en la embriogénesis (Carrascosa, 2003).

Los principales tejidos blanco afectados por el IGF-1, en combinación con la hormona del crecimiento son los músculos, cartílagos, huesos, hígado, riñones, nervios, piel y pulmones.

En humanos, han sido detectados niveles de ARNm para el IGF-1 ya en el primer trimestre de gestación, aumentando considerablemente en el segundo y tercer trimestre. No todos los tejidos expresan ARNm para dicha hormona de manera similar, detectándose los niveles más elevados en el intestino, piel, riñón y pulmón, y niveles menores en el cerebro e hígado (Carrascosa, 2003).

En humanos, se comprobó la importancia del IGF-1 tanto en el crecimiento intrauterino como en el postnatal, así como el papel relevante de IGF-1 en la diferenciación y crecimiento de órganos fetales (Camacho-Hubner *et al.*, 1998; Arends *et al.*, 2002)

La importancia de IGF-1 en la regulación del crecimiento fetal ha sido puesta en manifiesto de una forma brillante, al valorarlo en modelos animales, donde el bloqueo de la expresión génica del gen de IGF-1 y el de su receptor conduce a un severo retraso de crecimiento prenatal y postnatal, afectando de forma importante el crecimiento del esqueleto óseo y del tejido muscular (Baker *et al.*, 1993; Powell-Baxtron *et al.*, 1993). Gluckman *et al.* (1992) también observaron diferencias en el patrón de crecimiento en relación a la cantidad de IGF-1 sintetizada. Así, cuando los embriones de ratones genéticamente seleccionados para expresar niveles altos y bajos de IGF-1 son transplantados en un ratón normal, aquellos embriones que expresan niveles elevados de IGF-1 crecen más que los que expresan niveles bajos de esta hormona.

En animales de experimentación, la IGF-1, la insulina, y sus receptores son expresados en el estadio de ocho células, y en estadios del desarrollo embrionario y fetal posteriores a la implantación, el IGF-1 se expresaría de manera muy importante, siendo el principal factor regulador del crecimiento, estimulando la síntesis de proteínas y la multiplicación celular, siendo sus efectos ejercidos a través de su propio receptor, y estando en muy bajas concentraciones plasmáticas durante el desarrollo fetal, incrementándose progresivamente en relación con el tamaño y la edad fetal en todos los tejidos (Carrascosa, 2003).

Receptores de IGF-1 fueron detectados en la glándula pituitaria, plexo coroideo, núcleo supraquiasmático, núcleo paraventricular y eminencia media del hipotálamo (Lesniak *et al.*, 1988; Marks *et al.*, 1991; Bondy *et al.*, 1992; de Keyser *et al.*, 1994). Parece probable que la IGF-1 encontrada en el tejido cerebral tiene origen sistémico y local, ya que experimentos detectaron su ARNm en diferentes áreas del sistema nervioso central (Bondy *et al.*, 1992), sin embargo, en el hipotálamo parecería ser poca la expresión de dicha hormona (Lauterio *et al.*, 1990; Bondy *et al.*, 1992).

El IGF-1 actúa dentro del sistema nervioso y es fundamental para el crecimiento y desarrollo de las neuronas, por lo tanto es un factor neurotrófico, interviene en la comunicación neuromuscular y juega un papel importante en el envejecimiento celular, de tal manera que las células cuando envejecen requieren más cantidad de IGF-1.

Trabajos realizados en mamíferos indican que la insulina, IGF-1, sus proteínas transportadoras y sus receptores fueron encontrados en varios tejidos del cuerpo, donde ellos controlan los procesos anabólicos y catabólicos que constituyen las respuestas a cambios en el nivel de nutrición. Los tratamientos nutricionales alteran la expresión de sus genes en sus tejidos de origen, y esos efectos llevan a cambios en sus concentraciones circulantes. Muchas de esas respuestas están correlacionadas, algunas positivamente y otras negativamente, con los efectos de esos tratamientos nutricionales sobre la función reproductiva. La mayoría de los miembros del sistema IGF (IGF-1, proteínas transportadoras y receptores) se encontraron en el cerebro y tejido ovárico, y la presencia de esos ARNm demostraron que muchos de ellos se sintetizaron ahí. Esto incrementa la posibilidad de que algunas de las respuestas reproductivas no están solamente mediadas por la acción hormonal clásica de los productos del páncreas o el hígado, sino también por efectos autócrinos y parácrinos del sistema IGF, a todos los niveles del eje cerebro-pituitario-ovario (Monget y Martín, 1997).

Poco se conoce sobre los factores que regulan la síntesis de IGF-1 durante la vida fetal. A diferencia de lo que ocurre en el desarrollo postnatal, donde la hormona de crecimiento y el aporte de nutrientes regulan los niveles plasmáticos de IGF-1, las bajas concentraciones de esta hormona observadas durante el desarrollo fetal poco tienen que ver con las elevadas concentraciones de hormona de crecimiento de este período. El aporte de nutrientes y el estado nutricional del feto parecen ser los mayores agentes reguladores de los IGFs. En efecto, niveles bajos de IGF-1 se han observado en la sangre de cordón de

recién nacidos con bajo peso al nacer, y valores elevados de estas mismas hormonas en los recién nacidos con sobrepeso. Interesantemente, en estos mismos grupos de recién nacidos los niveles de insulina en sangre de cordón estaban disminuidos en aquellos que presentaban retraso de crecimiento intrauterino, y eran elevados en los recién nacidos con sobrepeso (Arosio *et al.*, 1995; LoHC *et al.*, 2002; Chanoie *et al.*, 2002; Giudice *et al.*, 1995).

Thissen *et al.* (1994) compararon la secreción de insulina con la secreción de IGF-1, y demostraron que la secreción de insulina está agudamente regulada por la disponibilidad de glucosa, y bajo condiciones de nutrición normal las concentraciones de insulina circulante fluctúan durante el día debido a cambios en el consumo de alimento, especialmente en monogástricos. En contraste, se observan pequeños cambios en las concentraciones de IGF en plasma o ningún cambio. Condiciones de ayuno y subnutrición crónica reducen las concentraciones de insulina e IGF-1 en sangre. Todas esas respuestas son principalmente debido a cambios en la expresión de los genes respectivos y puede constituir un mecanismo de adaptación que favorece la lipólisis e incrementa la disponibilidad de ácidos grasos al tejido adiposo.

La restricción del alimento también afecta la circulación de proteínas transportadoras, incrementándose las concentraciones de IGFBP-1 e IGFBP-2, y reduciéndose las concentraciones de IGFBP-3. Esos efectos son esencialmente debido a cambios en la expresión del gen en el hígado, más que a cambios en la actividad proteolítica-IGFBP, y eso altera la disponibilidad de IGFs en los tejidos blancos. Experimentos en cerdos con privación de alimento mostraron que el incremento en las concentraciones séricas de IGFBP-1 y 2 son responsables de la reducción de la síntesis de IGF-1. (Gosiewska *et al.*, 1994). Según Thiessen *et al.* (1994), la sub-alimentación también es acompañada por la resistencia periférica a las acciones de la insulina e IGF-1.

Todos estos datos indican la estrecha relación que existe entre aporte de nutrientes al feto, expresividad de IGFs, insulinemia y crecimiento fetal, siendo la nutrición fetal uno de los agentes más importantes en la regulación de su crecimiento. Durante el desarrollo fetal parece ser que la disponibilidad tisular de nutrientes, y particularmente de glucosa, desempeñarían un papel en la regulación de la síntesis de IGF-1 (Birnbacher *et al.*, 1998; Reece *et al.*, 1994). Sin embargo, los datos clínicos sugieren que los factores nutricionales posiblemente desempeñen el papel más importante en la expresión de los niveles tisulares de IGF-1, al asociarse sus concentraciones plasmáticas más

elevadas con las épocas del desarrollo fetal en las que el incremento ponderal es mayor.

2.5 INSULINA

En 1909 Meyer describió a esta hormona hasta entonces hipotética, luego, en 1922 Banting y Best aislaron la insulina por primera vez del páncreas. Cinco años más tarde, se consiguió preparar una muestra muy purificada de insulina, constituyendo ésta la principal hormona pancreática.

En 1960 se comprobó que la insulina se sintetizaba como una proteína mayor, que denominaron pro-insulina. Actualmente, se ha demostrado que lo que se sintetizaba no era la pro-insulina como tal, sino una molécula de mayor tamaño, la pre-pro-insulina con un peso molecular de 11500 daltons, la cual se trata de la pro-insulina con una pequeña molécula inicial de aminoácidos. La pre-pro-insulina sufre un proceso de degradación por la acción de proteasas, transformándose finalmente en la pro-insulina cuyo peso molecular es de 9000 aproximadamente. La molécula elemental de insulina con un peso molecular de 6000, contiene dos cadenas polipeptídicas (α y β) formadas por 51 aminoácidos, unidos entre si por puentes disulfuro.

La insulina es sintetizada por las células beta del páncreas, secretada en alta frecuencia (Goodner et al., 1977) dependiendo de la glucosa absorbida o en los rumiantes, también de la absorción de propionato o butirato. Cuando se secreta esta hormona hacia la sangre, circula casi por completo en forma libre; tiene una semi desintegración plasmática media del orden de seis minutos, de modo que desaparece de la circulación en un plazo de 10 a 15 minutos.

Los efectos biológicos de la hormona sólo alcanzan su grado máximo después de dos a cuatro horas. La acción relativamente prolongada de la insulina tiene lugar porque es captada y fijada por los tejidos sobre los cuales ejerce sus acciones.

La mayor parte de estos tejidos, en particular el hígado y los riñones, fijan la insulina y también tienen la capacidad de destruirla, los más activos son: hígado, páncreas, riñón y placenta.

El estímulo más importante en muchas especies para la síntesis y secreción de insulina, es la glucosa (fructosa, ribosa y manosa); también hay otros factores que pueden estimular las células beta, como la presencia de aminoácidos (p.e: arginina y lisina) estimulan la liberación de insulina únicamente cuando hay glucosa, mientras que otros (p.ej: leucina) no requiere glucosa para la estimulación y pueden actuar directamente sobre la liberación de insulina.

Varias hormonas gastrointestinales similares en estructura química, como, secretina, colecistocinina, gastrina, polipéptido intestinal vasoactivo, enteroglucagon y polipéptido inhibitorio gástrico, estimulan directamente las células beta para liberar insulina. Se considera al polipéptido inhibitorio gástrico como la hormona gastrointestinal más importante en la estimulación de liberación de insulina. Tanto la glucosa como la grasa en el intestino estimulan la liberación del polipéptido inhibitorio gástrico.

La célula beta se comporta como un verdadero glucostato, siendo sensible a pequeñas variaciones de la concentración de glucosa en sangre. Tras un incremento de la glucosa en sangre, la célula beta responde en segundos al estímulo, mediante la secreción de insulina, siguiendo un patrón característico. En primer lugar secreta la insulina ya sintetizada, e inmediatamente comienza una fase de síntesis y secreción simultánea, que permitir la utilización de glucosa en los tejidos extrahepáticos y estimula el almacenamiento de glucógeno hepático.

El sistema nervioso parasimpático (estimulador) ejerce también una influencia positiva en la liberación de insulina. El estímulo del nervio vago incrementa la liberación de insulina al activar los receptores de las células beta.

La glucosa provoca un incremento en los niveles de AMPc en las células beta, esto favorece la liberación de insulina solo en presencia de glucosa.

Además de proveer glucosa, la alimentación provoca una estimulación nerviosa del páncreas y liberación de hormonas gastrointestinales, que a su vez estimulan la liberación de insulina.

La privación completa de la insulina da lugar a diversos efectos que afectan a todo el metabolismo del organismo, incluyendo grasas, proteínas, carbohidratos, electrolitos y agua.

A corto plazo, en pocos segundos, incrementa la oferta intracelular de sustratos para el almacenamiento de energía, activando sistemas de transporte, intensificando la absorción de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos.

A mediano plazo, los efectos más importantes se producen sobre la actividad enzimática, fundamentalmente sobre la síntesis de triglicéridos y glucógeno.

La acción de la insulina es facilitar el transporte de la glucosa a través de la membrana plasmática. Una vez dentro de las células, éstas la utilizan como combustible, manteniendo a su vez los niveles de glucosa en la sangre dentro de lo normal: 0.7 a 1.1 gr./L en humanos; 0.4 a 0.6 gr/L en ovinos.

Todos los efectos señalados anteriormente están mediados por un receptor de membrana. Esta claro que la insulina se une a receptores específicos de la membrana plasmática, pero del segundo mensajero poco se conoce.

Los receptores para la insulina son estructuras dinámicas, que en condiciones fisiológicas y patológicas pueden modificar su capacidad de unión a la insulina. Los niveles circulantes de la hormona pueden modificar o regular sus propios receptores, en el sentido de que una disminución de insulina circulante facilita la unión de la insulina al receptor, y viceversa.

El receptor de la membrana plasmática para la insulina está constituido por glucoproteínas divididas en cuatro subunidades, dos alfa (135000) y dos beta (95000), unidas entre si por puentes disulfuro. La estructura del receptor para la insulina es muy semejante al factor del crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1). La insulina por ser una hormona anabólica disminuye también los niveles de AMPc en algunas células blanco (p.e: tejido adiposo) inhibiendo la proteína cinasa A y estimulando la enzima que degrada al AMPc, fosfodiesterasa. (Mc Donald, 1991).

Las concentraciones de insulina en plasma materno a lo largo de la gestación parecen ser altamente dependientes del consumo de la dieta al momento del muestreo, también se observó que las concentraciones de insulina materna durante el segundo y tercer trimestres de preñez estuvieron negativamente correlacionadas con el peso placental total y con el peso de los corderos al nacimiento (Wallace et al 1999).

La insulina, que actúa vía sus receptores sobre el adipocito es aceptada como el mayor estimulador de la lipogénesis en la grasa subcutánea en ovejas preñadas (Vernon et al., 1981; Guesnet et al., 1991), y los niveles de insulina claramente elevados en ovejas con un alto consumo se corresponden con este rol.

Es considerada una hormona clave en la regulación del crecimiento fetal, el que realiza a través de sus efectos promotores del anabolismo tisular. Estimula la síntesis proteica, la síntesis de glucógeno y regula la lipólisis durante el desarrollo fetal. Además, durante el desarrollo embrionario estimula la síntesis de ADN, efecto que no es retenido durante el desarrollo fetal a concentraciones fisiológicas (Milner y Hill, 1984). Así mismo, estimula la absorción de la glucosa por las células, fundamentalmente por las del hígado y el tejido muscular, para que se transformen en glucógeno hepático y muscular. Se produce así una disminución de glucosa en sangre (hormona hipoglucemiante).

Numerosos datos clínicos avalan la importancia de la insulina en la regulación del crecimiento fetal, a diferencia de lo que ocurre con otras hormonas, como la hormona del crecimiento. Estos datos apoyan la idea de que el crecimiento fetal es regulado fundamentalmente por el aporte nutricional a unas células con gran capacidad de multiplicación y diferenciación, y que los mecanismos hormonales de regulación endócrina del crecimiento se instauran durante la vida extrauterina. Efectivamente, en situaciones de hipoinsulinemia crónica que provocan una mala utilización de los nutrientes aportados al feto, se ha observado un retraso de crecimiento evidente. Lo contrario ocurre en situaciones de hiperinsulinemia fetal crónica, donde un exceso de crecimiento relacionado fundamentalmente con el incremento de tejido adiposo se ha observado en hijos de madres diabéticas mal controladas. Los niveles de insulinemia e IGFBP1 en la sangre del cordón del recién nacido con retraso en el crecimiento intrauterino, con peso normal y con sobrepeso, añaden nuevos

datos al papel relevante de la insulina en el crecimiento, así como su regulación por el aporte de nutrientes al feto (Giudice et al., 1995).

3. MATERIALES Y METODOS

Todo el protocolo experimental se llevó a cabo de acuerdo con el Código de Prácticas que ha sido formulado por el Consejo Australiano de Salud e Investigación Médica e implementado por el Comité de Ética Animal de la Universidad del Oeste de Australia (Western Australia University).

3.1 LOCALIZACIÓN

El trabajo se realizó en la Universidad de Western Australia, Perth, (UWA) ubicada a 31°56' de latitud Sur. Parte del trabajo como la selección de animales, ecografía y la amniocentesis se realizó en la Estación Experimental de Allandale (70 Km. al este del Campus), los tratamientos nutricionales se realizaron en las instalaciones para experimentos bajo control (Large Animal Facility) que se encuentran en el propio Campus. Las muestras de sangre se procesaron en el laboratorio del Departamento de Ciencia Animal de la UWA. El trabajo de campo se realizó en el año 2000.

3.2 ANIMALES

De una majada de 130 ovejas adultas y encarneradas de la raza Merino Australiano, se seleccionaron 25 con un peso promedio de 49 ± 7 kg y una condición corporal promedio de $1,6 \pm 0,4$ (escala de 1-5) Los criterios de selección fueron dos: que la gestación fuera simple, y que los fetos fueran machos. Esto último se debió a que había interés de probar si el aporte de energía metabolizable durante la gestación era capaz de modificar el número de células de Sertoli en la progenie machos (Bielli et al., 2002).

El descarte de las gestaciones múltiples se realizó en tiempo real por imagen ecográfica en la 9^{na} semana de gestación. En ese mismo momento se realizó una amniocentesis a cada oveja que tenía feto único vivo. Se utilizó un transductor de 3.5 MHz (Echo Camera SSD-500; Aloka, Tokio, Japón) y como medio se usó etanol. Para aspirar el líquido amniótico se utilizó una aguja espinal N°21 (Terumo, Cheltenham, Victoria, Australia). La aguja fue insertada en el saco amniótico, sirviendo de guía la imagen ecográfica. Los placentomas

fueron cuidadosamente evitados. Se extrajeron primero 1-2 ml. de líquido los que fueron descartados para disminuir la posible contaminación con células maternas. Posteriormente, se cambiaba la jeringa y 10 ml de líquido eran aspirados en cada oveja. Todos estos procedimientos, fueron precedidos por la esquila, afeitado, limpieza y antisepsia de la zona inguinal derecha y media.

El líquido fue analizado por contenido de electrolitos utilizando un equipo Rapidblad 860 (Bayer Diagnostic, Mulgrave, Victoria, Australia) para confirmar su origen amniótico y descartar la posibilidad de haber obtenido líquido alantoide. Se midieron las concentraciones de Na, K, Cl fundamentalmente. Las concentraciones de estos electrolitos en ambos líquidos placentarios son lo suficientemente diferentes como para poder diferenciarlos: líquido amniótico: 138 ± 1 ; $15,7 \pm 1,2$ y 124 ± 1 mmol/l para Na, K, Cl respectivamente, mientras que en el líquido alantoide las concentraciones de los mismos electrolitos son: 49 ± 5 ; $3,3 \pm 5,6$ y $30,3 \pm 3$ mmol/l, respectivamente (Wintour et al., 1994). En ninguna de las muestras obtenidas hubo duda de que lo que se había obtenido era una muestra de líquido amniótico.

Posteriormente el líquido amniótico fue centrifugado a 1500 g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se añadió una suspensión de Chelex 100 al 5% (Bio Rad, Hercules, CA, EEUU) al pellet restante en el tubo. Se mezcló cuidadosamente y se hirvió durante 10 minutos para lisar las células y liberar el DNA. Una alícuota de este DNA fue utilizada en la cadena de reacción de la polimerasa (PCR) con los primeros SCUcd043.fwd/SCUcd0.43.rev y P1-5EZ/P2-3Ez para amplificar el cromosoma ovino Y el locus ZFY/ZFX (Gutiérrez-Adán *et al*; 1997). La mezcla reaccionante consistió en 1 U Taq polimerasa (Boehringer Mannheim, Alemania), 100 μ M de cada deoxinucleótido trifosfato (Boehringer Mannheim, Alemania), 0,1 μ M de cada primer y mM de $MgCl_2$.

El PCR fue corrido usando un ciclador térmico PTC-100 (MJ Research, Waltham, MA, USA) y los productos resultantes fueron sometidos a electroforesis en un gel de 1% de agarosa para resolver las bandas de ZFY/ZFX e Y ADN. Dos bandas distintas indicaron un feto macho y una única banda indicó un feto hembra.

3.3 TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Teniendo en cuenta el peso y condición corporal de las hembras, estas fueron asignadas al azar a uno de los dos tratamientos nutricionales: a) grupo 110% de energía metabolizable (n=12). Estos animales recibieron desde la

10ma. semana de gestación hasta el fin del experimento 110% de sus requerimientos de energía metabolizable calculada sobre su peso metabólico. b) Grupo 70% de energía metabolizable (n=13). Estos animales recibieron 70% de sus requerimientos durante el mismo período que el grupo anterior. Los requerimientos para ovejas gestantes se obtuvieron de las recomendaciones del United Kingdom Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF, 1975). El peso metabólico se calculó de acuerdo a la fórmula:

Peso metabólico = peso vivo^{0.75} (peso metabólico = raíz cuadrada de la raíz cuadrada de peso³).

Para poder controlar que la alimentación que recibía cada oveja era la asignada de acuerdo al tratamiento, las hembras fueron trasladadas desde la estación experimental al Campus y alojadas en jaulas individuales, provistas de bebederos tipo chupón (agua *ad libitum*) en el edificio para manejo de experimentos controlados. Las instalaciones contaban con un termostato que permitió mantener la temperatura controlada (23-25°C). También se dispuso de un sistema automatizado para regular el fotoperíodo de acuerdo al protocolo experimental. En este trabajo, las ovejas fueron mantenidas con un régimen de luz que simulaba el fotoperíodo natural para la época del año y la latitud en la que se encontraban.

Los animales eran alimentados una vez al día a las 10:00, y eran controlados dos veces al día. Se controlaba su estado sanitario y comportamiento, con especial énfasis en signos clínicos de toxemia de gestación.

Desde la semana 10 a la 17 de gestación, la dieta estuvo compuesta por 80% de paja de cereal, 20% de semilla de lupino y 2% de mezcla mineral; 8,7 MJ/Kg. Energía Metabolizable (EM) y 12 % de Proteína Cruda (PC). Al inicio de la semana 18, la dieta fue cambiada a una más concentrada, con previa adaptación durante 5 días, compuesta por 48% de paja de cereal, 25% de semilla de lupino, 25% de grano de cebada y 2% de mezcla mineral, conteniendo 9,8 MJ/Kg. de EM y 14% de PC.

Cada animal recibió su ración de acuerdo al grupo de tratamiento y ésta fue modificada semanalmente de acuerdo a su peso metabólico. El mismo día de la semana, durante todas las semanas del experimento, las hembras en ayunas eran pesadas en la mañana (entre las 9:00 y 10:00 horas) por el mismo técnico y la misma balanza. Al día siguiente y también a la misma hora con los

animales en ayunas, se les extraían muestras de sangre de la vena yugular con tubos heparinizados; una gota era utilizada para medir la glucemia en el momento y el resto de la sangre era centrifugada y almacenada en freezer a -20°C.

Se realizó control de partos las 24 horas del día. Inmediatamente que la bolsa amniótica era vista asomarse por la vagina, es decir, inicio de la segunda etapa del parto o expulsión fetal, se tomaba una muestra de sangre de la vena yugular de la madre y se medía la concentración de glucosa, y con el resto de la muestra se procedía de la forma ya descrita. Esta muestra se consideró representativa del parto. Una vez nacida la cría, se permitía el reconocimiento maternal y el lamido de la oveja, pero antes de que la cría mamara se lo pesaba (peso al nacimiento) y se le extraían 3 ml de la vena yugular, se medían los niveles de glucosa y se procedía de igual manera que en los casos anteriores. Dos días después el cordero era pesado nuevamente, y se le tomaba una muestra de 10 ml. de sangre de la vena yugular del lado contrario a la vez anterior y se procedía igual. Posteriormente, era trasladado a la sala de necropsia, donde era cateterizado en la vena yugular, anestesiado con pentobarbital sódico. Inmediatamente después se extraían los órganos genitales, los que fueron usados para otras mediciones ajenas a esta tesis. Luego era sacrificado por sobredosis y las adrenales extraídas para otro estudio. Una vez muerto, se extraían el hígado y ambos riñones los cuales eran pesados en una balanza de precisión.

3.4 ANÁLISIS DE HORMONAS Y METABOLITOS.

3.4.1 Glucosa

La glucosa en sangre fue medida al momento de la recolección utilizando un glucometro y electrodos sensores (MediSense2®; MediSense, Inc. Massachusetts) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se tomo una lectura por muestra, y el rango del aparato fue de 1,1 a 33,3 mmol/L (20-600mg/dl). El rango de muestras de ovejas y corderos fue de 1,8 a 16,5 mmol/L.

3.4.2 Insulina.

La insulina en plasma fue medida por el método Radio Inmuno Análisis de doble anticuerpos de Hales y Randle (1963), modificado por Basset y Wallace (1966) y descrito por Tindal et al., (1978) y validado para ovinos (Miller, 1995). Las muestras y curva standard fueron medidas en duplicado mientras que los controles fueron medidos en triplicado. Todas las muestras se analizaron en un

único ensayo. El límite de detección de insulina fue de $0,78\mu\text{UI/ml}$. El coeficiente de variación intra-ensayo fue de 13% para el control bajo ($1,78\mu\text{UI/ml}$), 4,7% para el medio ($3,32\mu\text{UI/ml}$) y 6,3% para el control alto ($10,84\mu\text{UI/ml}$).

3.4.3 IGF-1.

El contenido de IGF-1 en las muestras, fue medido por el método Chloramine-TRIA descrito en detalle por Gluckman et al., (1983). La interferencia con cintas proteicas fue minimizada por el método de crio precipitación con ácido etanol validado para muestreo en rumiantes por Breier et al. (1991). La curva standard y las muestras fueron corridas en duplicado, mientras que los controles se hicieron en triplicado. Todas las muestras se corrieron en un solo ensayo. El límite de detección del ensayo fue $0,1\text{ng/ml}$. El coeficiente de variación intra-ensayo fue de 6,6% para $1,8\text{ ng/ml}$, 12,7% para $2,3\text{ ng/ml}$ y 11,1% para $6,8\text{ ng/ml}$.

3.4.4 LEPTINA.

La concentración de leptina fue medida utilizando un RIA de doble anticuerpo desarrollado por Blache *et al* (1999) para ovinos. Se utilizó un anticuerpo producido en emú, leptina bovina marcada con I^{125} . El límite de detección del ensayo fue de 01 ng/mL . El coeficiente de variación intra-ensayo fue de 11% para $0,6\text{ ng/mL}$, 9.8 para 0.7 ng/mL y 30% para 1 ng/mL .

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental utilizado para las madres fue un arreglo factorial con dos factores: *tratamiento nutricional*, con dos niveles: 110 y 70% de los requerimientos de energía metabolizable y *semana de gestación*, desde la semana 10 al parto. Para las crías, se utilizó también un arreglo factorial de 2×2 en aquellas variables de respuesta que fueron medidas a las 0 y 48 horas de nacer, los factores eran *la dieta de las madres* y *el momento de la medición*.

Las hembras fueron asignadas al azar teniendo en cuenta su peso, logrando dos grupos con promedio de peso y condición corporal similar.

Los datos obtenidos de las madres fueron analizados utilizando un análisis de muestras repetidas en el tiempo. El modelo incluyó los efectos de los *tratamientos nutricionales*, *la semana de gestación*, y la interacción entre ambos factores. La variación entre individuos dentro de tratamiento fue considerada dentro del error cuando se comparó tratamientos. Para la separación de medias se utilizó el D.M.S (Diferencia Mínima Significativa) a $P < 0.05$. La información se

analizó utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, 6.11), utilizando el procedimiento mixto (Proc Mixed) para datos repetidos en el tiempo. En el caso de las variables de corderos, aquellas que fueron medidas en dos momentos se procedió igual que con los datos de las madres. Para el resto de las variables, se realizó primero un Test de Student. También se realizaron análisis de Covarianza, considerando al peso al nacer como covariable y en el caso de las madres la condición corporal. Este procedimiento también fue realizado en el paquete estadístico SAS 6.11. Se corrieron correlaciones de Pearson entre las variables más significativas. Los resultados se expresan en media \pm e.e.m (error estándar de la media).

4. RESULTADOS.

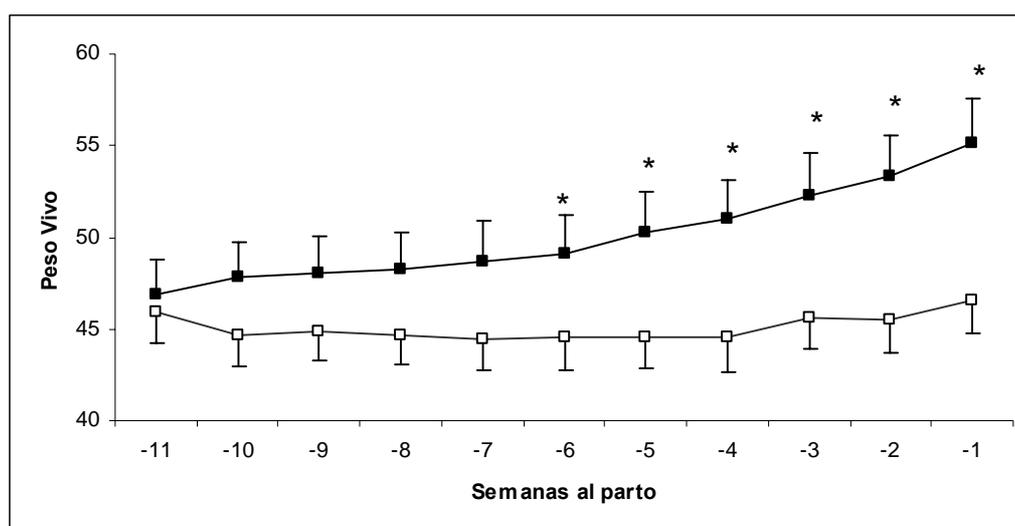
Con las fechas al parto se reajustaron las semanas de gestación en que los tratamientos comenzaron y los datos de las ovejas fueron agrupados de acuerdo a la exacta semana en que se encontraban al momento de iniciar los tratamientos. Por lo que en el grupo 110% EM las observaciones quedaron distribuidas de la siguiente manera: cinco ovejas se encontraba en la semana 10 de gestación (10 semanas antes del parto); cuatro en la semana 9 de gestación (11 semanas antes del parto) y tres ovejas en la semana 8 (12 antes del parto). En el grupo 70% EM la distribución fue la siguiente: nueve ovejas se encontraban gestantes de 10 semanas (10 semanas antes del parto), y cuatro en la semana 9 de gestación (11 semanas antes del parto).

4.1 VARIABLES MORFOLOGICAS

4.1.1 Peso de las madres.

Como consecuencia de los tratamientos nutricionales las ovejas del grupo 70% EM mantuvieron peso durante el experimento, mientras que el peso promedio de las hembras del grupo 110% se incrementó en 12% durante el mismo periodo. La interacción tratamiento*semana de gestación fue significativa ($P=0.0001$). Las diferencias de peso entre los tratamientos fueron significativas ($P<0.05$) a partir de la semana 14 (Gráfica 1).

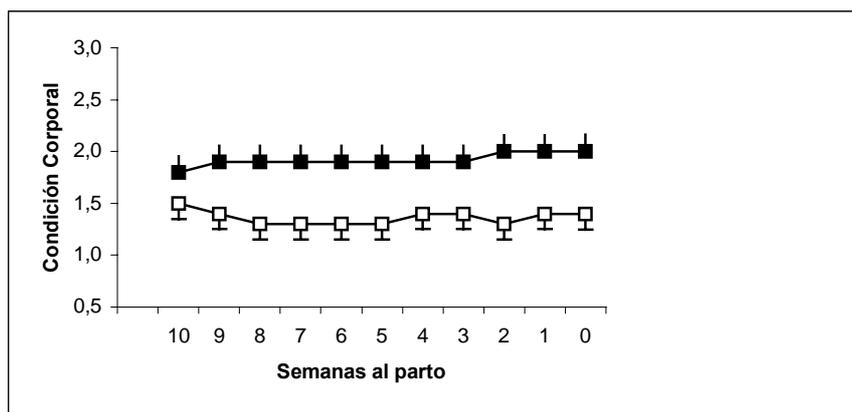
Gráfica N°1. Evolución del peso vivo (media \pm e.e.m.) en ovejas preñadas alimentadas con 70% EM [(□), n=13]; o 110% EM [(■), n=12] de sus requerimientos de energía metabolizable desde la semana 11 previa al parto. * P<0,05



4.1.2 Condición corporal de las madres.

La condición corporal de las madres fue mayor en el grupo 110% EM que en el grupo 70% EM (1.9 ± 0.1 vs. 1.4 ± 0.1 , respectivamente; $P = 0.0087$). Sin embargo la semana de gestación no afectó esta variable ($P = 0.8415$) y contrariamente a lo esperado no se encontró interacción tratamiento*semana de gestación ($P = 0.2498$). Los resultados se muestran en la Gráfica 2.

Gráfica N° 2. Evolución de la condición corporal (media \pm e.e.m.) en ovejas preñadas alimentadas con 70% EM [(□), n=13]; o 110% EM [(■), n=12] de sus requerimientos de energía metabolizable desde la semana 11 previa al parto



4.1.3 Peso de la placenta.

El peso de la placenta no fue afectado por los diferentes niveles de energía suministrados ($P=0.178$). Sin embargo, cuando se estimó la relación entre los gramos de placenta requeridos para producir un kilo de cordero (peso placenta/peso cordero) se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($P=0,002$). Los datos se presentan en el cuadro 1.

4.1.4 Peso de los corderos

La sub-alimentación energética de las madres determinó que los corderos pesaran menos al nacer ($P<0.05$) que los nacidos de madres alimentadas con 110% de sus requerimientos energéticos. En ambos grupos se observó un aumento de peso en las primeras 48 horas de vida ($P<0.05$), pero la diferencia inicial entre tratamientos se mantuvo ($P<0.05$). Los datos se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro N° 1. Peso (Kg) de los corderos (al nacer y a 48hs), peso de la placenta (gr) y eficiencia de la placenta (peso placenta/peso nacimiento, gr) de corderos Merino cuyas madres fueron alimentadas con 110% (n=12) o 70% (n=13) de sus requerimientos de Energía Metabolizable (EM) ($x \pm e.e.m.$)

	110% EM		70% EM	
	x	e.e.m	x	e.e.m
Peso de placenta (gr)	397.36	39.78	472.75	36.97
Gramos de placenta/kg cordero	71.98 ^a	4.77	98.46 ^b	5.45
Peso al nacer (kg)	5.45 ^a	0.08	4.78 ^b	0.05
Peso a las 48 horas (kg)	5.90 ^c	0.25	5.09 ^d	0.16

Literales diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$)

4.1.5 Pesos de Hígado y Riñones de corderos

En el momento de la necropsia se encontró que el peso promedio del hígado fue 37% superior ($P=0.018$) y el de los riñones (izquierdo + derecho) 21% superior ($P=0.003$) en los corderos cuyas madres fueron alimentadas con 110% de sus requerimientos de EM que en los corderos cuyas madres fueron alimentadas con 70% de los requerimientos de EM. Los datos se presentan en el cuadro N°2.

Cuadro N° 2. Peso del hígado y peso de riñones (gr) a las 48 horas de corderos nacidos de madres alimentadas con 70% o 110% de sus requerimientos de energía metabolizable (EM) desde la 10ma semana de gestación hasta el parto ($x \pm e.e.m.$, gr)

	110% EM			70% EM		
	x	\pm	e.e.m	x	\pm	e.e.m
Peso del hígado (gr)	169.09 ^a		0.17	123.21 ^b		7.89
Peso de riñones (gr)	18.76 ^a		1.02	15.42 ^b		0.40

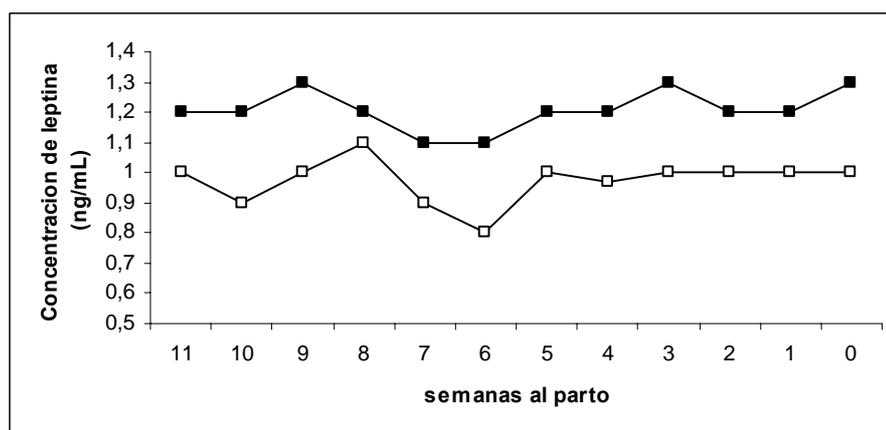
Literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

4.2 VARIABLES METABÓLICAS Y ENDÓCRINAS

4.2.1 Leptina

La concentración de leptina en las madres no varió a lo largo de la gestación ($P=0.1553$). El tratamiento nutricional determinó ($P=0.0503$) que las hembras del grupo 110% EM tuvieran valores más altos ($1,30 \pm 0,09$) que las ovejas del grupo 70% ($0,99 \pm 0,09$ ng/mL EM). Esta diferencia no se explica por la diferencia en condición corporal (covariable $P = 0,3324$). Los resultados se observan en el gráfico 3.

Gráfica N° 3. Evolución de las concentraciones de leptina (media \pm e.e.m.) en ovejas preñadas alimentadas con 70% EM [(□), n=13]; o 110% EM [(■), n=12] de sus requerimientos de energía metabolizable desde la semana 11 previa al parto



La concentración de leptina en los corderos (Cuadro N°3) no fue diferente en los recién nacidos, pero los corderos hijos de las madres del grupo 110% EM presentaron valores más altos ($P<0.05$) a las 48 horas de nacidos que los del grupo 70% EM. La diferencia no se explica por la diferencia de pesos (covariable: $P = 0.2862$).

Cuadro N° 3. Concentración de leptina (ng/mL) al nacimiento y a las 48 horas de corderos nacidos de madres alimentadas con 110% o 70% de sus requerimientos de EM ($x \pm e.e.m$).

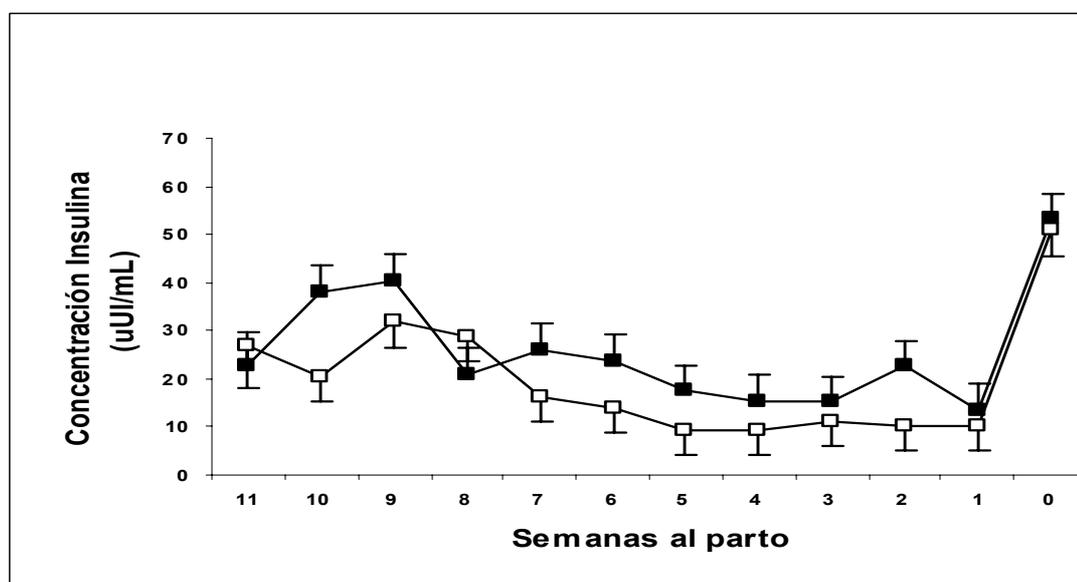
	110% EM		70% EM	
	x	$\pm e.e.m$	x	$\pm e.e.m$
Leptina al nacimiento (ng/mL)	0.72 ^a	0.05	0.73 ^a	0.06
Leptina a las 48 horas	1.32 ^b	0.09	0.86 ^a	0.11

Literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

4.2.2 Insulina e IGF-1.

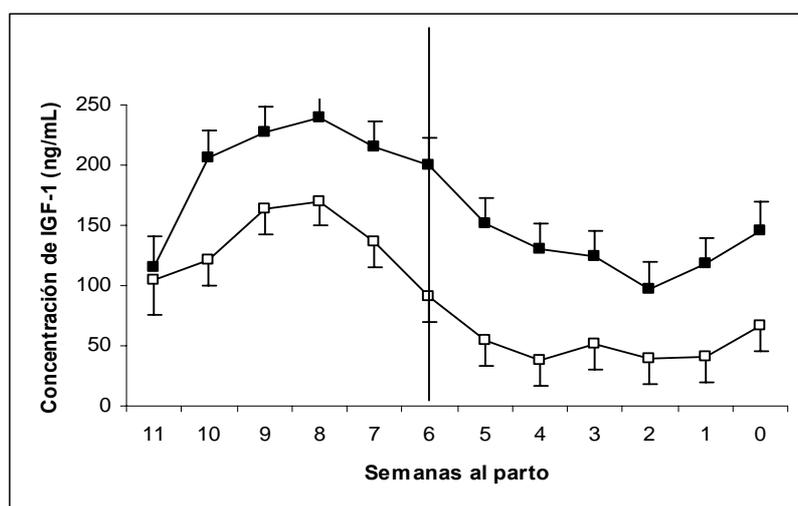
El tratamiento afectó la concentración de insulina ($P = 0,0412$), siendo mayores los valores de las madres del grupo 110% EM ($22,7 \pm 2,9$ vs. $16,9 \pm 2,8$ $\mu\text{U/mL}$). Sin embargo, al utilizar el análisis de covarianza, con la condición corporal como covariable ($P=0,0279$) esta significancia se perdió ($P=0.1522$). Los niveles plasmáticos de insulina variaron en ambos grupos de acuerdo a la edad de gestación ($P = 0.0001$) y no se encontró una interacción tratamiento*semana significativa ($P = 0,0136$).

Gráfica N°4. Evolución de las concentraciones de insulina (media \pm e.e.m) en ovejas preñadas alimentadas con 110% (■) o 70% (□) de sus requerimientos de EM desde la semana 11 previa al parto.



La concentración de IGF-1 en las madres fue afectada por los tratamientos nutricionales ($P=0.0089$). El promedio de dicho factor de crecimiento durante todo el experimento de las ovejas del grupo 110%EM fue 164.97 ± 8.51 ng/ml, mientras que en el grupo de 70%EM fue 88.88 ± 5.85 ng/ml incluyendo la concentración al parto. La misma fue influenciada por la semana de gestación ($P=0.0001$). sin embargo, no se encontró interacción tratamiento*semana.

Gráfica N°5. Evolución de las concentraciones de IGF-1 (media \pm e.e.m) en ovejas preñadas alimentadas con 110% (■) o 70% (□) de sus requerimientos de EM desde la semana 11 previa al parto.



Los corderos cuyas madres fueron alimentadas con 110% de sus requerimientos de EM tuvieron concentraciones de insulina a las 48 horas de vida superiores ($P=0.022$) que los corderos cuyas madres fueron alimentadas con 70% de sus requerimientos de EM. Esta diferencia no se explica por la diferencia de peso de los corderos al nacer (covarianza $P=0.7941$).

El tratamiento nutricional que recibieron las madres durante el trabajo significó que las crías tuvieran concentraciones de IGF-1 diferentes 48 horas después de nacer ($P=0.0079$). Esta diferencia tampoco es explicada por la diferencia de peso de los corderos al nacer (covarianza: $P=0.244$). Ambos resultados se observan en el cuadro N°4.

Cuadro N°4. Concentración de insulina y de IGF-1 ($x \pm e.e.m$, $\mu\text{UI/ml}$, ng/ml) de corderos Merino cuyas madres fueron alimentadas con 70% o 110% de sus requerimientos de EM a las 48 horas de nacidos.

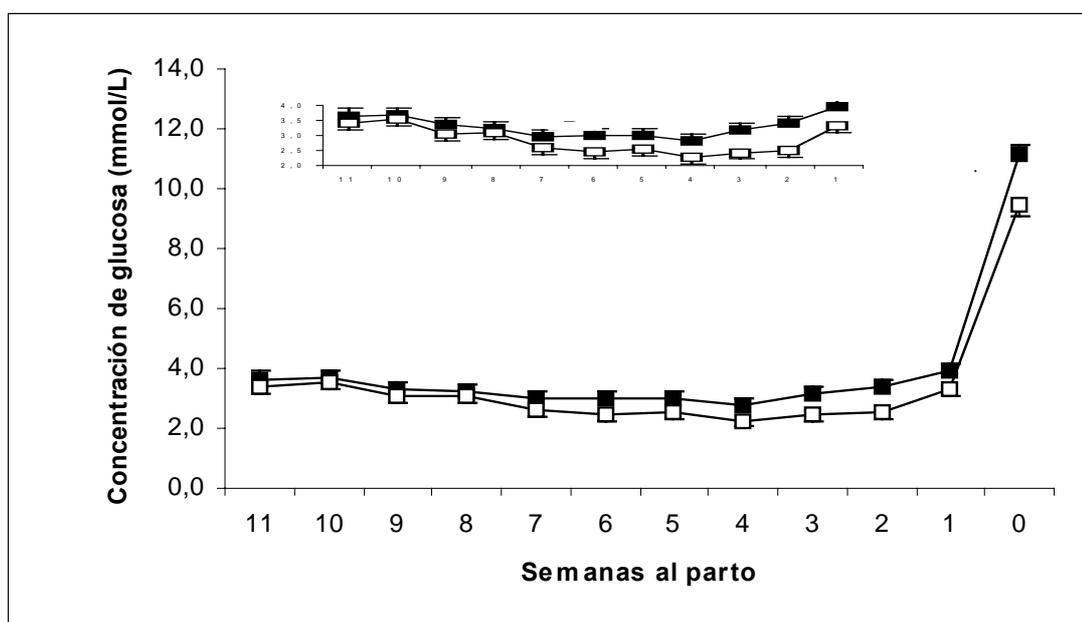
	110% EM		70% EM	
	x	$\pm e.e.m$	x	$\pm e.e.m$
Concentración de insulina ($\mu\text{UI/ml}$)	173.69 ^a	40.57	66.11 ^b	19.69
Concentración de IGF-1 (ng/ml)	272.7 ^a	36.14	156.5 ^b	19.17

Literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

4.2.3 Glucosa.

La concentración de glucosa en las madres fue afectada por los tratamientos nutricionales ($P=0.0002$) siendo mayor en el grupo de madres alimentadas con 110%EM (3.95 ± 0.09) que en las ovejas del grupo 70%EM ($3,39 \pm 0.09$). También la semana de gestación influyó esta variable ($P=0.0001$). Sin embargo, no se encontró interacción tratamiento*semana. En ambos grupos se observó un incremento de la glucemia de más de 200% al momento del parto (expulsión fetal), lo que se observa en la gráfica N°6.

Gráfica N°6. A. Evolución de la concentración de glucosa en madres que reciben 70% o 110% de los requerimientos de EM desde la 11va semana previa al parto hasta el momento del parto. B. Los mismos animales sin la semana del parto.



En el siguiente cuadro presentaremos los resultados de la concentración de glucosa en los corderos por tratamiento y edad. El tratamiento nutricional que recibieron las madres significó que las crías tuvieran concentraciones de glucosa diferentes al momento de nacer ($P=0.0001$) pero no 48 horas después. En ambos grupos la concentración de glucosa se incrementó ($P<0.05$) a las 48 horas. Esta diferencia de glucemia al momento del nacimiento no es explicada por el peso de la cría (análisis de covarianza: $P=0.4879$).

Cuadro N°5. Concentración de glucosa ($x \pm e.e.m$, m mol/L) de corderos Merino cuyas madres fueron alimentadas con 70% y 110% de sus requerimientos de EM al momento del nacimiento y a las 48 horas de nacidos.

	110% EM		70% EM	
	x	$\pm e.e.m$	x	$\pm e.e.m$
Glucosa al nacimiento (m mol/L)	3.39 ^a	0.23	2.12 ^b	0.13
Glucosa a las 48 horas (m mol/L)	7.70 ^c	0.32	7.07 ^c	0.27

Literales diferentes indican diferencias significativas ($P<0.05$).

5. DISCUSIÓN

Luego de analizar el efecto de dos tratamientos nutricionales (70% EM: subnutrición y 110% EM: 10% por encima del mantenimiento) sobre variables morfológicas y endocrinas de ovejas Merino Australiano y sus crías, observamos, como era de esperar, que las madres mejor alimentadas (110% EM) presentaron mayores pesos que las madres subalimentadas (70% EM), haciéndose significativa esta diferencia partir de la semana 14 hasta el parto, incrementando las primeras su peso en un 12%, mientras que las del grupo 70% EM mantuvieron su peso vivo durante el periodo experimental. Sin embargo, si restamos el peso de la placenta y del feto (0.5% y 10% del peso de las madres, respectivamente, para ambos tratamientos) al peso de las madres al final de los tratamientos, sin considerar los líquidos que no se midieron, observamos que el aumento de peso registrado en el grupo 110% EM desaparece y es similar al peso de inicio. Por lo que se puede considerar que fue una dieta de mantenimiento. De la misma manera, el grupo que recibió 70% de sus requerimientos energéticos, no mantuvo el peso sino que lo disminuyó en un 14% respecto a su peso inicial, lo que confirma que éstos animales recibieron una dieta energética insuficiente.

Es decir, que nuestros modelos de investigación fueron animales gestantes en balance energético en equilibrio (cero) y balance energético negativo.

Las diferencias de peso entre los grupos se hizo significativa a partir de la sexta semana previa al parto. Dicho de otra manera, en el último tercio de la gestación, cuando el feto entra en la fase de crecimiento por mitosis acelerada y sus requerimientos se incrementan notablemente. En ese momento las hembras deben recurrir a sus reservas corporales para compensar el insuficiente aporte energético de la dieta.

Sin embargo, la condición corporal, si bien fue afectada por los tratamientos nutricionales se mantuvo sin cambios detectables a lo largo de la gestación.

Sabiendo que la glucosa es la fuente principal de energía para la mayoría de las células, obtenida a partir de los precursores de la dieta ó de la conversión de otros metabolitos (Marichal et al., 1996), las ovejas alimentadas con 110%

EM presentaron mayor concentración de este metabolito que el grupo subalimentadas. Para ambos tratamientos se vio que la concentración de glucosa estaba dentro de los niveles normales establecidos según Mellor, (1981) para ovejas preñadas y bien alimentadas. En nuestro trabajo se observó que las ovejas sub-alimentadas presentaron una reducción de la glucemia luego de comenzar el tratamiento, y fue mas baja que el grupo que recibió 110% de sus requerimientos de energía metabolizable. Ambos grupos aumentaron pronunciadamente su concentración en la semana del parto, lo cual coincide con los datos publicados por Banchemo et al., (2004). Este aumento podría deberse a la liberación de cortisol fetal, señal que desencadena el parto (Liggins, 1982), que incrementa la concentración de este glucocorticoide en la sangre, tanto materno como fetal, con el consecuente aumento de la glucosa, dada la naturaleza hiperglucemiante del cortisol. Teniendo en cuenta que al momento del parto la endocrinología que sustentaba la gestación cambia drásticamente, el incremento del cortisol tiene como uno de sus efectos aumentar la glucemia (Stabenfeldt y Edquist, 1999), y este aumento puede explicar el aumento de insulina en ambos grupos.

En las madres del grupo 70%EM, se observo que si bien fueron subalimentadas, esto no repercutió en la producción de glucosa para transferirle al feto, ya que siguieron produciendo este metabolito a partir de la movilización de reservas corporales, pero si repercutió en la disminución del peso final de esas madres luego del parto.

Los resultados observados de la hormona IGF-1 en madres para ambos tratamientos nutricionales, mostraron un incremento de la misma desde la semana 11va hasta la octava semana previa al parto, momento en el cual fue máxima la concentración de esta hormona, comenzando a disminuir en la semana 7ma hasta la cuarta semana previa al parto, donde la concentración fue mínima y luego permaneció constante hasta el momento del parto en el cual se incremento. Debemos marcar que no hubo interacción tratamiento*semana, y que las concentraciones de esta hormona fueron mayores en las madres alimentadas con 110% EM en comparación a las madres 70% EM a lo largo de la gestación, lo que se explicaría por tratarse de una hormona esencialmente anabólica y mitogénica (Harding et al., 1994; Brameld et al., 1998), cuya fuente mas importante es el hígado (Miller et al., 1981), por lo que se encuentra positivamente correlacionada con los niveles nutricionales (Breier et al., 1986). Esta relación no solo explicaría las diferencias entre tratamientos, sino que también podría explicar el descenso de las concentraciones de esta hormona en ambos grupos en las semanas previas al parto. Estos resultados son comparables con los resultados de Wallace (1999), donde las concentraciones

de IGF 1 en plasma durante el segundo y tercer trimestre fueron significativamente elevadas en dietas de alto consumo comparado con consumo moderado, y estuvieron negativamente correlacionadas con el peso de los corderos al nacimiento. Las concentraciones de insulina e IGF 1 materna durante la gestación reflejan el consumo de la dieta materna y fueron similares a resultados previos de otros experimentos (Wallace et al., 1997).

Por su parte, las diferencias en el aporte de energía se vieron reflejadas en diferencias entre los niveles de leptina en las madres. Es así, que la media general del tratamiento 110% EM fue mayor ($P < 0.05$) que la del grupo 70% EM. Esto concuerda con la bibliografía estudiada, donde se vio que las ovejas que consumían mayor cantidad de alimento, tenían un mayor peso corporal que las sub-alimentadas, lo que implica que van a tener más deposición de tejido adiposo, y por lo tanto, más secreción de leptina. (Adam et al., 2003; Thomas et al., 2001)

Sin embargo, los niveles de esta hormona no variaron a lo largo de la gestación. Estos resultados no concuerdan con trabajos realizados en mujeres gestantes (Carrascosa y Yestes, 1999; Hoggard et al., 1998) ni con los resultados de Wallace et al (2001) y Ehrhardt et al. (2001) en ovejas, pero si son coincidentes con los resultados de Thomas et al (2001) quienes no encontraron hiperleptinemia en la preñez tardía en ovejas.

Coincidiendo con lo esperado, los corderos nacidos de madres mejor alimentadas (110% EM) tuvieron pesos mayores al nacimiento comparado con los corderos nacidos de madres subalimentadas (70% EM), observándose a las 48 horas, una mayor tasa de crecimiento en aquellos nacidos de madres mejor alimentadas. La nutrición maternal es una de las mayores variables extrínsecas conocidas que influyen en el peso al nacimiento en variadas especies (Robinson 1994), pero en ovejas, la evidencia de efectos operando vía alteraciones en el crecimiento de la placenta mediante la nutrición ha sido variable y a veces conflictiva (Kelly 1992). Sin embargo, en nuestro trabajo, ambas variables estuvieron estrechamente asociadas. Es posible que al iniciar los tratamientos nutricionales en la semana 10, estos no afectaron el desarrollo de la placenta, el que termina por establecerse alrededor de esa fecha. Lo que se confirma al no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas en los pesos de las placentas de ambos grupos (Bello e Ibáñez, 2003). En ovejas el peso máximo de la placenta es alcanzado en la mitad de la gestación, con remodelación estructural sobre la segunda mitad de preñez (Haesman et

al., 1999), alcanzando aproximadamente el 95% de su peso final en los primeros 90 días de la gestación, mientras que el feto en ese lapso solamente alcanza el 15% de su peso final (Russell, 1979). Erhardat y Bell (1995) observaron que el crecimiento placentario es rápido desde el día 40 hasta el día 80, sin que hubiera cambios en el contenido de materia seca en el tejido después del día 100. El crecimiento absoluto de la placenta alcanza su máximo alrededor del día 55 y se produce concomitantemente con el periodo de máxima hiperplasia (día 50 a 60).

Nuestros datos demostraron mayor peso del hígado y riñones de los corderos nacidos de madres mejor alimentadas, los cuales podrían asociarse a las diferencias de peso vivo y concentraciones de insulina e IGF-1. De hecho, existe correlación positiva entre peso de los corderos a las 48 horas de vida y el peso de estos órganos. Es esperable que el hígado, órgano metabólico por excelencia, sea más pesado en los corderos cuyo peso corporal es mayor.

El feto obtiene glucosa como fuente de energía fundamentalmente a través del torrente sanguíneo materno (relación directa entre captación de glucosa por el feto y concentración de glucosa en sangre materna), ya que tiene baja capacidad de sintetizar glucosa a partir de metabolitos gluconeogénicos (Liggins, 1982). La placenta ovina permite el pasaje de glucosa y aminoácidos como sustrato para el crecimiento fetal (Jainudeen, et al., 1996), lo que explicaría la reducción de glucosa observada en las madres de nuestro trabajo a partir de la 12va. semana de gestación para ambos tratamientos nutricionales.

Al nacimiento los corderos presentaron diferencias en glucemia, lo cual estaría explicada por la mayor disponibilidad de este metabolito en las madres. A las 48 horas de nacidos los niveles de glucosa que alcancen dependerán del éxito que hallan tenido los corderos en lograr establecer el amamantamiento, ya que las reservas de glucosa (como glucógeno) hepáticas tienen una duración limitada en el cordero de menos de 24 horas (Liggins, 1982). Como en este trabajo todos los corderos consumieron calostro, es esperable que las concentraciones de glucosa a los dos días de vida no sean diferentes si las madres le suministraron suficiente cantidad de nutrientes por esta vía. Esto concuerda con los resultados obtenidos en nuestro trabajo donde la diferencia en los niveles de glucosa debidas al tratamiento de las madres desapareció a las 48 horas, aumentando en ambos grupos, pero con mayor proporción en los corderos hijos de madres subalimentadas.

Una posible explicación sería que los corderos de madres subalimentadas fueron más eficientes en la utilización de nutrientes provenientes del calostro, y de esta manera compensar las deficiencias sufridas durante la etapa intrauterina.

Este hallazgo inesperado, no se relaciona con los hallazgos en leptina a las 48 horas, la que tuvo un comportamiento contrario (no diferencias al nacimiento, aumento mayor en el grupo 110% EM 48 horas después) posiblemente por el aporte de energía que recibieron estos corderos por el calostro. En efecto, la suplementación energética una semana antes del parto, incrementa el contenido de lactosa en el calostro, por lo que es razonable pensar que la disponibilidad de glucosa para ser absorbida en la pared intestinal también aumentaría. La glucosa parece no estar involucrada directamente en la síntesis de leptina. En efecto, si bien cambios en la dieta provocan cambios en la glucemia (Harman, 1991; Boukhliq et al., 1996) y en los ácidos grasos volátiles, la hiperglucemia en humanos no parece estimular la secreción de leptina (Ryan & Elahi, 1996). Y por otra parte, no se ha encontrado una correlación entre las concentraciones de AGV y leptina en sangre (Kolaczynski et al., 1996).

La IGF1 de los hijos de madres con 110% EM a las 48 horas de nacidos fue mayor que la de hijos de madres alimentadas con 70% EM, lo que era esperable por la relación directa entre la IGF-1 y la nutrición. Banchemo et al (2000), trabajando con este mismo lote experimental, demostró que las madres mejor alimentadas al final de la gestación producen mayor volumen de calostro y de mejor calidad, lo que explica los resultados encontrados.

La alimentación recibida por las madres no afectó la concentración de leptina de sus hijos al nacimiento, pero en las primeras 48 horas de vida los niveles de esta hormona aumentaron en los hijos de las madres que recibían 110% EM (43%), y se mantuvo en los hijos de las madres subalimentadas.

A pesar de que la mayor parte de la literatura consideran al peso corporal y el contenido de grasa (Maffei et al., 1995; Havel et al., 1996) como el factor más importante de la regulación de la leptina, en nuestro trabajo esta relación no fue evidente. En efecto, los pesos al nacimiento fueron diferentes y las concentraciones de leptina en ese momento fueron similares, aumentando en ambos grupos el peso corporal pero no la leptina en las primeras 48 horas, la cual solo aumento en corderos nacidos de madres alimentadas con 110%EM.

Esto nos lleva a pensar que la causa de las diferencias en la concentración de leptina se deba al consumo de nutrientes provenientes del calostro en ese período más que a los eventos intrauterinos, ya que lo único que realizaron los corderos en esas primeras 48 horas de vida fue consumir calostro. El calostro es la fuente de energía más importante y la única fuente de inmunoglobulinas y agua para los corderos en las primeras horas de nacidos (Pattinson et al., 1995). Estudios recientes realizados por Banchero et al (2004) demostraron que la suplementación de madres con alimentos energéticos (maíz molido) durante la última semana de gestación aumentó la cantidad y calidad de calostro producido, reflejándose en un mejor comportamiento de los corderos luego del nacimiento, quienes dispusieron del doble de proteína y energía metabolizable durante las primeras 10 horas de vida, comparado con hijos de madres no suplementadas. En este trabajo se demostró que el alimento disponible para las ovejas no suplementadas fue insuficiente para una adecuada lactación y que el régimen hormonal en estos animales puede ser inapropiado para un buen desarrollo de la ubre y síntesis de calostro comparado con animales suplementados. Estos hallazgos, podrían explicar la diferencia de concentraciones de leptina a las 48 horas como también la mayor tasa de crecimiento en las primeras 48 horas de nacidos.

La concentración de insulina a las 48 horas fueron mayor en los corderos hijos del grupo 110% EM que en los hijos de madres sub-alimentadas. Estos últimos tuvieron una insulinemia 43% menor que los primeros. La insulina ha sido postulada como una de las señales que estimulan la secreción de leptina en humanos, ya que regula la expresión del gen OB en el tejido adiposo en humanos (Saladin et al., 1996). Havell (2000) demostró que la concentración de leptina circulante monitorea la masa de grasa corporal, siguiendo la concentración de esta hormona el mismo patrón de concentración de insulina en plasma, encontrándose una correlación positiva entre insulina y leptina en plasma. De este modo, confirmaron el concepto de la insulina como regulador de los cambios en la secreción de leptina cuando se suministraba energía. Hay un acuerdo general sobre el rol de la insulina en el control de la secreción de leptina. (Ashima et al., 2000), a pesar de que parte de la literatura en humanos no es coincidente con el rol de la hiperinsulinemia (Goumenou et al., 2002). Por otra parte, Ekert et al., (2000) trabajando con lechones provenientes de madres que habían sido alimentadas diferencialmente encontraron que a los 59 días la concentración de leptina era mayor en la camada de madres mejor alimentadas.

Con estos resultados podríamos sugerir que las diferencias de leptina en corderos a las 48 horas de vida se deban, entre otros factores, a las diferentes

concentraciones de insulina que presentaron. Resultados de nuestro trabajo demuestran que corderos hijos de madres alimentadas con 110%EM presentaron 163% mas de insulina que los corderos hijos de madres alimentadas con 70%EM, lo que podría reafirmar la bibliografía consultada, donde la insulina es un regulador positivo de la síntesis de leptina. (Carrascosa y Yeste, 1999)

6. CONCLUSIONES

1. La nutrición durante la gestación tiene consecuencias en el desarrollo y crecimiento de los fetos y, por lo tanto, en la supervivencia de las crías (Programación fetal).
2. Se encontró efecto de los tratamientos en todas las variables medidas. Las diferencias se hicieron significativas a partir de la 6ta semana previa al parto en todas las variables, excepto en condición corporal, lo que coincide con en el último tercio de gestación, donde los requerimientos del feto y de la madre aumentan considerablemente.
3. Las madres mejor alimentadas presentan mayor peso vivo, condición corporal, glucosa y concentración de todas las hormonas metabólicas (insulina, IGF-1, **Leptina**)
4. Ovejas sub alimentadas energéticamente durante la gestación producen corderos más livianos, con menores concentraciones de glucosa al nacer lo que pone a riesgo su sobrevivencia.
5. A las 48 horas, estos corderos presentan menores concentraciones de leptina, IGF1 e insulina, es decir de hormonas esencialmente metabólicas y vinculadas al crecimiento.
6. Respecto al rol de la leptina en la producción animal, concluimos que al tratarse de una hormona recientemente descubierta, todavía falta información sobre su rol en modelos animales, donde podría tener una importante función como regulador del consumo voluntario.

7. RESUMEN

El estado nutricional de las hembras durante la preñez, puede ser crítico en el crecimiento posnatal y desarrollo de su descendencia, provocando en algunos casos cambios permanentes en la vida extrauterina ("Programación Fetal"). Para ovejas Merino se evaluaron dos niveles de energía metabolizable (EM) ingeridos (110% de sus requerimientos de mantenimiento de masa corporal y crecimiento normal de concepción (n=12); 70% de esos requerimientos (n=13)) desde la semana 10 de gestación hasta el parto y luego se evaluó efectos en peso vivo, tamaño de los órganos de las crías machos y concentración de hormonas y metabolitos. Las ovejas eran pesadas semanalmente y los corderos eran pesados al momento de nacer y dos días después. Se tomaron muestras de sangre en el mismo momento. Ovejas de 70% EM no ganaron peso, sin embargo las ovejas de 110% EM ganaron 12% sobre su peso inicial de la semana 10. Estas últimas presentaron concentraciones plasmáticas de glucosa superiores (P= 0,0006), mayor concentración plasmática de IGF-1 (P= 0,0089) y de insulina (P= 0,0412) que las ovejas de 70% EM. La concentración plasmática de leptina no difirió (P= 0,1553). El peso al nacer y a las 48 horas de vida fue superior en corderos de 110% EM que en corderos de 70% EM (P< 0,05). El tamaño de hígado y riñones fueron ambos superiores en el grupo de 110% EM que en 70% EM. La concentración de glucosa en los corderos al momento de nacer fue superior (P= 0,0001) en el grupo de 110% EEM que en el grupo 70% EM, sin embargo la concentración de leptina no fue afectada por los distintos niveles de energía al momento de nacer pero sí a las 48 horas de vida, donde los corderos nacidos de madres que recibieron 110% EM presentaron concentraciones mayores que los nacidos de madres alimentadas con 70% EM (P=< 0,005). A las 48 horas de vida se encontraron niveles superiores de insulina y de IGF-1 (P= 0,022 y P= 0,0079, respectivamente) en los corderos de 110% EM que en el grupo de 70% EM. Concluimos que la subalimentación durante la preñez provoca cambios en el metabolismo de la madre gestante y puede reducir el crecimiento y desarrollo de la descendencia.

8. SUMMARY

The nutritional status of females during pregnancy can play a critical role in the postnatal growth and development of the offspring, often leading to permanent changes in extrauterine life ("Fetal Programming). For Merino ewes, we evaluated two levels of metabolizable energy (ME) intake (110% of requirement for maintenance of ewe body and normal growth conceptus (n=12); 70% of those requirement (n=13)) from week 10 of pregnancy until parturition and then tested for effects on body weight, shape of organs in new-born males and metabolite and hormone plasma concentration. Pregnant ewes were weighed weekly and lambs were weighed at birth and two days later. Blood was sample at the same times. 70% ME ewes did not gain weight, whereas 110% ME ewes gained 12% over their pre-treatment weight. This last group showed higher plasmatic concentrations of glucose (P= 0,0006), higher concentration of IGF-1 (P= 0,0089) and insulin (P= 0,0412) than 70% ME ewes. Plasmatic concentration of leptin did not differ (P= 0,1553). Birthweight and weights 48 hours later were higher in 110% ME lambs than in 70% ME lambs (P< 0,05). The size of the liver and kidneys were both higher in 119% ME group than in the 70% ME group. Glucose concentration in lambs at the time of birth was higher (P= 0,0001) in the 110% ME group than in the 70% ME group, however the leptin concentration at birth was not affected for the energy level intake, but was affected 48 hours later where 110% ME lambs showed higher level than 70% ME lambs (P< 0,005). 48 hours after birth, 110% ME lambs showed higher insulin and IGF-1 concentrations (P= 0,022 and P= 0,0079, respectively) than 70% ME lambs. We conclude that under nutrition during pregnancy may produce changes in the metabolism of the pregnant ewes and can reduce growth and development of the offspring.

9. BIBLIOGRAFIA

ADAM, C.L.; ARCHER, Z.A.; MILLER, D.W. 2003. Leptin actions on the reproductive neuroendocrine axis in sheep. *Reprod Suppl.* 61: 283-297.

ADAMSON, E.D. 1993. Activities of growth factors in preimplantation embryos. *J Cell Biochem* 53: 280-287.

AHIMA, R.S.; PRABAKARAN, D.; MANTZOROS, C.; QU, D.; LOWELL, B.; MARATOS-FLIER, E.; FLIER, J.S. 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382: 250-252.

ARENDS, N.; JOHNSTON, L.; HOKKEN-COLEGA, A. 2002. Polimorphism in the IGF-1 gene: clinical relevance for short children born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2720. (Medline)

AROSIO, M.; CORTELAZZI, D.; PERSANI, L. 1995. Circulating levels of growth hormone, insuline like growth factor 1 and prolactin in normal, growth retarded and anencephalic human fetuses. *J Endocrinol Invest* 18: 346-353. (Medline)

AUWERX, J.; STAELS, B. 1998. Leptin. *The Lancet.* 351: 737.42.

BADO, A. ; LEVASSEURS, S. ; ATTOUB, S. ; KERMORGANT, S. ; LAIGNEAU, J.P. ; BORTOLUZZI, M.N et al. 1998. The stomach is a source of leptin. *Nature* 394 : 790-793

BAKER, J.; LIU, J.P.; ROBERTSON, E.J.; EFSTRATIADIS, A. 1993. Role of insulin like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, 75: 73-82. (Medline).

BANKS, W.A.; KASTIN, A.J.; HUANG, W.; JASPAN, J.B Y MANESS, L.M 1996. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17:305-311.

BARASH, I.A.; CHEUNG, C.C.; WEIGLE, D.S.; REN, H.; KABITING, E.B.; KUIJPER, J.L.; CLIFTON, D.K Y STEINER, R.A 1996. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinol.* 137: 3144-3147.

BARKER, D.J.P.; GLUCKMAN, P.D y ROBINSON, J.S, (1995). Conference report: fetal origins of adult disease: report of the First International Study Group, Sydney, 29-30 October 1994. *Placenta* **16** 317-320.

BARKER-GIBB, M.L.; CLARKE,; I.J. 1996. Increased galanin and neuropeptide-Y immunoreactivity within the hypothalamus of ovariectomised ewes following a prolonged period of reduced body weight is associated with changes in plasma growth hormone but not gonadotropin levels. *Neuroendocrinology* **64**: 194-207.

BASSET, J.; WALLACE, A. 1966. Diluents for insulin standards in immunoassay of insulin in undiluted ovine plasma by a double antibody technique. *Journal of Endocrinology* **36**: 99-100.

BERNARDIS, L.L.; BELLINGER, L.L. 1998. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited; update. *Proc Soc Exp Biol Med* **198**; 218: 284-306.

BIELLI, A.; PEREZ, R.; PEDRANA, G.; MILTON, J.; LOPEZ, A.; BLACKBERRY, G. 2002. Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reproduction, Fertility and Development*. **14**: 333-337.

BJORBAEK, C.; UOTANI, S.; DA SILVA, B.; FLIER, J.S. 1997. Divergent signalling capacities of the long and the short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem*, **272**: 32686-32695.

BLACHE, D.; TELLAM, R.L.; CHAGAS, L.M.; BLACKBERRY, M.A.; VERCOE, P.E Y MARTÍN, G.B. 2000. Level of nutrition affects leptin concentration in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. *Journal of Endocrinology* **165** 365-367.

BOCQUIER, F.; BONNET, M.; FAULCONNIER, Y.; GUERRE, M.; MARTIN, P.; CHILLIARD, Y. 1998. effects of photoperiod and feeding level on perirenal adipose tissue metabolic activity and leptin synthesis in the ovariectomized ewe. *Reprod Nutr Dev* **38**: 489-498.

BODEN, G.; CHEN, X.; MOZZOLI, M.; RYAN, I. 1996. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, **81**: 3419-3423.

BONDY, C.A.; WERNER, H.; ROBERT, C.T.JR.; LE ROITH, D. 1990. Cellular pattern of insulin like growth factor 1 (IGF-1) and type 1 IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-2 gene expression. *Mol Endocrinol* **4**: 1386-1398. (Medline).

BONDY, C.A.; WERNER, H.; ROBERT, C.T.Jr.; LE ROITH, D. 1992. Cellular pattern of type-1 insuline like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: comparison with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience* 46: 909-923

BOUKHLIQ, R.; MILLER, D.W Y MARTIN, G.B. 1996. Relationships between the nutritional stimulation of gonadotrophin secretion and peripheral cerebrospinal fluid (CSF) concentration of glucose and insulin in rams. *Animal Reproduction Science* 41: 201-204.

BRAMELD, J.; BUTTERY, P.; DAWSON, L.; HARPER, J. 1998. Nutritional and hormonal control of skeletal muscle cell growth and differentiation. *Proceedings of the nutrition society*. 57: 207-217.

BRAY, G.A. 1996. Leptin and leptinomania. *The Lancet* 348: 140-142

BREIER, B.; BASS, J.; BUTLER, J.; GLUCKMAN, P. 1986. The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status on pulsatile release of growth hormone and circulating concentrations of insulin-like growth factor 1. *Journal of Endocrinology*. 111: 209-215.

CABRERA, V.M. 2000. Concentraciones de leptina y prolactina bioactive e inmunorreactiva durante el ciclo menstrual normal. *Rev Cubana de Endocrinología* 11(3): 143-152.

CAMACHO-HUBNER, C.; WOODS, K.A.; CLARK, A.J.L.; SAVAGE, M.O. 1998. Deficiencia primaria de IGF-1: diagnóstico y tratamiento. *An Esp Pediatr* 111: 26-28.

CARO. J.F et al. 1996. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistanse. *The Lancet* 348: 159-161.

CARRASCOSA, A.; AUDI, L. 1993. Human studies on the biological actions of IGF-1. Evidence suggesting that human fetal postnatal epiphyseal cartilage is a target tissue for IGF-1 action. *J Pediatr Endocrinol* 6: 257-261. (Medline)

CARRASCOSA, A.; YESTE, D. 1999. Leptina: una hormona del tejido adiposo. *Rev Chill* 26(1)

CARRASCOSA, A. 2003. Crecimiento intrauterino: factores reguladores. Retraso de crecimiento intrauterino. *An Pediatr* 58: 55-73.

CARRO, E.; SENARIS, R.; CONSIDINE, R.V.; CASANUEVA, F.F.; DIEGUEZ, C. 1997. Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology*, 138: 2203-2206.

CASTAGNA, L.; DE GREGORIO, T.; ALLEGRA, A.; BUEMI, M.; CORSONELO, A.; BONANZINGA, S, et al. 1998. Leptin: adipocyte hormone. *Recenti Prog Med* 89: 200-7.

CASTRACANE, V.D.; KRAEMER, R.R.; FRANKEN, M.A.; KRAEMER, G.R.; GIMPEL, T. 1998. Serum leptin concentration in women: effect of age, obesity, and estrogen administration. *Fertil Steril* 70: 472-7.

CEDDIA, R.B.; WILLIAM, W.N.; LIMA, F.B.; CARPINELLI, A.R.; CURI, R. 1998. Pivotal role of leptin in insulin effects. *Braz J Med Biol Res* 31: 715-22.

CELI, P.; MARTIN, G.B.; BLACHE, D.; VERCOE, P.E.; TELLAM, R.L. 2000. Effects of central administration of recombinant bovine leptin on pulsatile LH secretion in male sheep under different feeding regimes. *Australian Society for Reproductive Biology*. 31, 29.

CELI, P.; MARTIN, G.B.; BLACHE, D.; VERCOE, P.E.; DYNES, R.A and TELLAM, R.L. 2000. Effects of intracerebral recombinant bovine leptin on pulsatile LH secretion and voluntary food intake in male sheep. *Australian Society for Reproductive Biology*. 29, 60.

CHAGAS, L.; BLACHE, D.; BLACKBERRY, M.A.; TELLAM, R.L.; VERCOE, P.E and MARTIN, G.B. 1999. *Endocrin Society of Australian*. 42, 86.

CHANOIE, J.P.; YEUNG, L.P.; WONG, A.C.; BIRMINGHAM, C.L. 2002. Immunoreactive ghrelin in human cord blood: relation to anthropometry, leptin and growth hormone. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35: 282-286. (Medline)

CHAPMAN, I.M.; WITTERT, G.A.; NORMAN, R.J. 1997. Circulating leptin concentrations in polycystic ovary syndrome: relation to anthropometric and metabolic parameter. *Clin Endocrinol (Oxford)* 46: 175-81.

CHEHAB, F.F.; LIM, M.E.; LU, R. 1996. Connection of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 12: 318-20.

CHEUNG, C.C.; THORNTON, J.E.; KUIJPER, J.L.; WEIGLE, D.S.; CLIFTON, D.K Y STEINER, R.A. 1997. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinol* 138: 855-858.

CHUA, S.C.; Jr; CHUNG, W.K.; WU-PENG, X.S.; ZHANG, Y.; LEEU, S.M.; TARTAGLIA, L.; LEIBEL, R.L. 1996. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*, 271: 994-996.

CIOFFI, J.; SHAFER, A.; ZUPANCIC, T. 1996. Novel B219/ob receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nature Med* 2: 585-9.

CIOFFI, J.; VAN BLERKOM, J.; ANTEZAK, M.; SHAFER, A.; WITHNER, S.; SNODGRASS, H.R. 1997. The statement of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod* 3: 467-72.

COLEMAN, D.L. 1978. Obese and diabetes: Two mutant genes causing diabetes-obesity syndrome in mice. *Diabetologia* 14: 141-148.

CONINGS, D.E.; GADE, R.; MUHLEMAN, D.; PETERS, W.R.; MAC MURRIA, J.P. 2001. The LEP gene and age of menarche: maternal age as a potential cause of hidden stratification association studies. *Mol Genet Metab* 73: 204-10.

CONSIDINE, R.V.; SINHA, M.K.; HEIMAN, M.L.; KRIAUCIUNAS, A.; STEPHENS, T.W.; NYCE, M.R.; OHANNESIAN, J.P.; MARCO, C.C.; McKee, L.J.; BAUER, T.L & CARO, J.F, 1996. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine* 334: 292-295.

CONSIDINE, R.V. 1997. Weight regulation. *Hormone Res* 48(Suppl 5): 116-21.

CUMIN, F.; BRAUM, H.P.; LEVENS, N. 1996. Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. *Int J Obesity* 20:1120-1126

DAGOGO-JACK, S.; FANELLI, C.; PARAMORE, D.; BROTHERS, J.; LANDT, M. 1996. Plasma leptin and insulin relationships in obese and nonobese humans. *Diabetes* 45: 695-8.

DELAVAUD, C.; BOCQUIER, F.; CHILLIARD, Y.; KEISLER, D.H.; GERTLER, A.; KANN, G. 2000. plasma leptin determinations in ruminants: effects of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *J Endocrinol* 165: 519-526.

DE KEYSER, J.; WILCZAK, N.; DE BACKER, J.P. 1994. Insulin-like growth factor-1 receptors in human brain and pituitary gland: an autoradiographic study. *Synapse* 17: 196-202.

EHRHARDT, R.A. ; SLEPETIS, R.M. ; BELL, A.W. ; BOISCLAIR, Y.R. 2001. Maternal leptin is elevated during pregnancy in sheep. *Domest Anim Endocrinol* 21 : 85-96.

EHRHARDT, R.; BELL, A. 1995. Growth and metabolism of the ovine placenta during mid-gestation. *Placenta*. 16: 727-741.

EKERT, J.E.; GATFORD, K.L.; LUXFORD, B.G.; CAMPBELL, R.G.; OWENS, P.C. 2000. Leptin expression in offspring is programmed by nutrition in pregnancy. *J Endocrinol* 165: R1-R6.

ENGELGERGT, M.; HOUDIJK, M.; POPP-SNIJDERS, C.;DELEMARRE-VAN DE WALL, H. 2000. The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatric Research*. 48(6): 803-807.

FOWDEN, A.1997. Comparative aspects of fetal carbohydrate metabolism. *Equine Veterinary Journal*. 24: 19-25.

FREDERICH, R.C.; LOLLMANN, B.; HAMANN, A.; NAPOLITANO-ROSEN, A.; KAHN, B.B.; LOWELL, B.B.; FLIER, J.S. 1995. Expression of ob RNAm and its encoded protein in rodent. Impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest* 96: 1658-1663

FRIEDMAN, J.M y HALAAS, J.L. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395: 763-770.

FRIEDMAN, J.M.; SOUKAS, A.; COHEN, P.; SOCCI, N.D. 2000. Dilucidando los efectos de la leptina. *Genes y Development*.

FUKUSHIMA, K.; COMATSU, H.; MATSUMOTO, H. 2002. IGF- related proteins at birth in a case of antenatalli diagnosed silver-russel syndrome. *Pediatr Res* 51: 323-327. (Medline)

GARCIA, M.R.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, S.W.; STNKO, R.L.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H.; NIZIELSKI, S.E.; WILLIAMS, G.L. 2002. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle and different seasons in cattle. *J Anim Sci*, in press.

GEMMELL, R.; ALEXANDER, G. 1978. Ultrastructural development of adipose tissue in fetal sheep. *Aust J Biol Sci* 31: 505-515.

GHILARDI, N.; ZIEGLER, S.; WIESTNER, A.; STOFFEL, R.; HEIM, M.H.; SKODA, R.C. 1996. Defective STAT signalling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 6231-6235.

GIUDICE, L.C.; ZEGHER, F.; GARGOSKY, S.E.; DESUPIN, B.A. 1995. Insuline like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1548-1555. (Medline).

GLUCKMAN, P.D. 1995. The endocrine regulation of fetal growth in late gestation: the role of insuline like growth factor. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1047-1050. (Medline).

GOODNER, C.; BERRIER, M. 1977. The failure of rat hypothalamic to take up labeled insulin *in vivo* or to respond to insulin *in vitro*. *Endocrinology* 101: 605-612.

GOSIEWSKA, A.; WILSON, S.; KWON, D y PETERKOFISKY, B. 1994. Evidence for an *in vitro* role of insulin-like growth factor-binding protein-1 and -2 as inhibitors of collagen gene expression in vitamin C-deficient and fasted guinea pigs. *Endocrinology* 134: 1329-1339.

GREENWOOD, P.L.; HUNT, A.S.; HERMANSON, J.W.; BELL, A.W. 1998. Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: I. Body growth and composition , and some aspects of energetic efficiency. *J Anim Sci* 76: 2354-2367.

GUEVARA-AGUIRRE, J. 1996. Insuline like growth factor 1 and important intrauterine growth factor. *N Engl J Med* 335: 1389-1391. (Medline)

HAFFNER, S.M.; MYKKANEN, L.; STERN, M.P. 1997. Leptin concentrations in women in the San Antonio Heart Study. Effect of menopausal status and postmenopausal hormone replacement therapy. *Am J Epidemiol* 146: 581-5.

HALAAS, J.L.; FRIEDMAN, J.M. Leptin and its receptor. *J Endocrinol*, 1997; 155: 215-216.

HALAAS, J.L.; GAJIWALA, K.S.; MAFFEI, M.; COHEN, S.L., CHAIT, B.T.; RABINOWITZ, D.; LALLONE, R.L.; BURLEY, S.K Y FIEDMAN, J.M. 1995. Weigth-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Sciense* 269: 543-546

HALES, C.; RANDLE, P. 1963. Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate. *Biochemical Journal* 88: 137-146.

HALLEUX, CM.; SERVAIS, I.; REUL, B.A.; DETRY, R.; BRICHARD, S.M. 1998. Multi-hormonal controls of obesity gene expression and leptin secretion from cultured human visceral adipose tissue: increased responsiveness to glucocorticoids in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 902-910.

HAMANN, A Y MATTHAEI, S. 1996. Regulation of energy balance by leptin. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 104: 293-300.

HARDING, J.; LIU, L.; EVANS, P.; GLUCKMAN, P. 1994. Insulin-like growth factor 1 alters fetal-placental protein and carbohydrate metabolism in fetal sheep. *Endocrinology* 134: 1509-1514.

HARDING, J.E. 1997. Periconceptual nutrition determines the fetal growth response to acute maternal undernutrition in fetal sheep of late gestation. *Prenatal and neonatal Medicine* 2 310-319.

HARDING, J.E Y JOHNSTON, B.M. 1995. Nutrition and fetal growth. *Reproduction, Fertility and Development* 7 539-547.

HARMAN, N.G. 1991. Energy metabolism in rested, exercised and overfed sheep. PhD Thesis. Murdoch University, Perth, Western Australia.

HAVEL, P.J.; KASIM-KARAKAS, S.; DUBUE, G.R.; MUELLER, W.; PHINNEY, S.D. 1996. Gender differences in plasma leptin concentrations. *Nat Med*, 2: 949-950.

HAYNES, W.G.; MORGAN, D.A.; WAISH, S.A.; SIVITZ, W.L.; MARK, A.L. 1998. Cardiovascular consequences of obesity. Role of leptin. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25: 65-9.

HAYNES, W.G.; SIVITZ, W.L.; MORGAN, D.A.; WAISH, S.A.; SIVITZ, W.L.; MARK, A.L. 1997. Sympathetic and cardiorenal actions of leptin. *Hypertension* 30: 619-23

HEASMAN, L.; CLARKE, L.; STEPHENSON, T.; SYMONDS, M. 1999. The influence of maternal nutrient restriction in early to mid-pregnancy on placental and fetal development in sheep. <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi>.

HEASMAN, L.; BRAMELD, J.; MOSTYN, A.; BUDGE, H.; DAWSON, J.; BUTTERY, P.; STEPHENSON, T.; SYMONS, M. 2000. Maternal nutrient

restricción durante temprano a medio-gestación altera la relación entre el factor de crecimiento similar a la insulina y el peso corporal al término en corderos fetales. *Reproduction fertility*. 12: 345-350.

HERVEY, G.R. 1958. The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol* 145: 336-352.

HOGGARD, N.; HUNTER, L.; DUNCAN, J.S.; WILLIAMS, L.M.; TRAYHURN, P. Y MERCER, J.G. 1997. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *PNAS* **94** 11073-11078.

HOGGARD, N.; HUNTER, L.; TRAYHURN, P.; WILLIAMS, L.M.; Y MERCER, J.G. 1998. Leptin and reproduction. *Proceedings of the Nutrition Society* **57** 421-427.

HOLMANG, A. 2001. Perinatal Origin of Adult Disease. IT-Wlab, Göteborgs Universitet.

HOLT, R.L. 2002. Fetal programming of the growth hormone insulin like growth axis. *Trend Endocrinol Metab* 13: 392-397.

HOUSEKNEEBT, K.L.; BAILE, C.A.; MATTERI, R.L.; SPURLOCK, M.E. 1998. The biology of leptin: a review. *J Anim Sci* 76: 405-20.

IBANEZ, L.; POTAU, N.; ENRIQUEZ, G.; DE ZEGHER, F. 2000. Reduced uterine and ovarian size in adolescent girls born small for gestational age. *Peritar Res* 47: 575-577.

JAINUDEEN, M.; AFEES, E. 1996. Gestación, fisiología prenatal y parto. In. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. (ed. E.S.E. Hafes). México, Prensa Tecnica, S.A.De C. B. Pp. 203-223.

JI, S.; WILLIS, G. M; SCOTT, R.R y SPURLOCK, M.E. 1998. Partial cloning and expression of the bovine leptin gene. *Anim. Biotechnol* 9 (1): 1-14

JIMENO, V.; MAJANO, M.A y REBOLLAR, P.G. 1997. En: XIII Curso de Especialización FEDNA. *Avances en Nutrición y Alimentación*. pp. 65-79

JIN, B.G.; BURGUERA, M.E.; COUCE, B.W.; SCHEITHAUER, J.; LAMSON, N.L.; EBERHARDT, E.; KULIG, E.; LLOYD, R.V. 1999. Leptin and leptin receptorexpression in the normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role of leptin on pituitary cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 2903-22911.

KAYE, P.L.; BELL, K.L.; BEEBE, L.F.; DUNGLISON, G.F.; GARDNER, H.G.; HARVEY, M.B. 1992. Insuline and the insuline like growth factors in preimplantations development. *Reprod Fertil Dev* 4: 373-386 (Medline).

KELLY, R. 1992. Nutrition and placental development. *Proceedings of the Nutrition Society of Australia*. 17: 203-311.

KENNEDY, G.C. 1953. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc Roy Soc* 140: 578-592.

KIEFFER, T.J.; HELLER, R.S.; HABENER, J.F. 1996. Leptin receptors expressed on pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Commun* 224: 522-7.

KOLACZYNSKI, J.W.; CONSIDINE, R.V.; OHANNESIAN, J.; MARCO, C.; OPENTANOVA, I.; NYCE, M.R.; MYINT, M.; CARO, J.F. 1996. Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes*, 45: 1511-1515.

LAKHO, G.R.; QURESHI, M.A. 2001. Leptin's implications in reproduction: current understandings. *J Pak Med Assoc* 51: 124-8.

LANT, M.; GINGERICH, R.L.; HABEL, P.J.; MUELLER, W.M.; SCHONER, B.; HALE, J.E & HEIMAN, M.L. 1998. Radioimmunoassay of rat leptin: sexual dimorphism reverse from humans. *Clinical Chemistry* 44: 565-570.

LASARRE, C.; HARDOUIN, S.; DAFFOS, F.; FORESTIER, F.; FRANKENE, F.; BINOUX, M. 1991. Serum insuline like growth factors and insuline like growth factors binding proteins in human fetus. Relationships with growth in normal subjects and subjects with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 29: 219-225. (Medline).

LEGRADI, C.H.; EMERSON, R.S.; AHIMA, J.S.; FLIER, R.M. 1997. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 138 (6): 2569-2576.

LE ROIT, D.; WARNER, H.; BEITNER-JOHNSON, D.; ROBERT, C.T JR. 1995. Molecular and cellular aspects of the insuline- like growth factor 1 receptor. *Endocr Rev* 16: 143-163 (Medline).

LESINAK, M.A.; Hill, J.m.; kiss, w. 1988. Receptors for insulin-like growth factors I and II: autoradiographic localization in rat brain and comparison to receptors for insulin. *Endocrinology* 123: 2089-2099.

LIGGINS, G. 1982. The fetus and birth. In. *Reproduction in mammals:2. Embryonic and fetal development. Second edition* (eds. C. Austin; R. Short). Cambridge, great Britain. University press. Pp. 114-141.

LO, H.C.; TSAO, L.Y.; HSU, W.Y.; CHEN, H.N.; YU, W.K.; CHI, C.Y. 2002. Relation of cord serum levels of growth hormone insuline like growth factor, leptin and interleukin 6 with birth weighth, birth length, and head circumference in term and preterm neonates. *Nutrition* 18: 604-608. (Medline)

MADEJ, T.; BOGUSKI, M.S.; BRYANT, S.H. 1995. Threading analysis suggest that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett* 373: 13-18.

MAFFEI, M.; HALAAS, J.; RAVUSSIN, E. 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Med* 1: 1155-61.

MALMSTROM, R.; TASKINEN, M.R.; KARONEN, S.L.; YKI-JIIRVINEN, H. 1996. Insulin increases: plasma leptin concentrations in normal subjects and patient with NIDDM. *Diabetologia* 39: 993-6.

MASUZAKI, H.; OGAWA, Y.; SAGAWA, N.; HOSADA, K.; MATSUMOTO, T.; MISE, T.; NISHIMURA, H.; YOSHIMASA, Y.; TANAKA, I.; MORI, T Y NAKAO, K. 1997. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature Medicine* 3 1029-1033.

MARICHAL, M.J.; TRUJILLO, A.I.; FERNANDEZ, M. 1996. Trastornos de origen nutricional. Montevideo. Facultad de Agronomía. 31p

MARKS, J.L.; PORTE, D y BASKIN, D.G. 1991. Localization of type I insulin-like growth factor receptor messenger RNA in the adult rat brain by *in situ* hybridization. *Mol. Endocrinol* 5: 1158-1168.

MC. DONALD, L.E.; PINEDA, M.H, eds. *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. 4ª.ed. México: Interamericana, 1991. pp 181-187.

McDOUGAL, O.H.; HWANG, C.S.; FAN, H.; LANE, M.D. 1995. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 9034-9037.

MELLOR, D.; MURRIA, L. 1981. *Research in veterinary Science*. 30: 198.

MILLER, L.; SCHALCH, D.; DRAZNIN, B. 1981. Role of the liver in regulating somatomedin activity: effects of streptozotocin diabetes and starvation on the synthesis and release of insulin-like growth factor and its carrier protein by the isolated perfused liver. *Endocrinology*. 108: 1265-1271.

MILLER, D. 1995. Neuroendocrine pathways involved in the nutritional stimulation of gonadotrophin secretion in male sheep. Thesis for Doctor of Philosophy. University of Western Australia, Faculty of Agriculture, Animal Science Group. 146p.

MOCKUS, I. 2001. Leptina: regulación y asociaciones en la obesidad. *Salud UIS* 33: 84-89.

MOINAT, M.; DENG, C.; MUZZIN, P.; ASSIMACOPOULOS, J.F.; SEYDOUX, J.; DULLOO, A.G.; GIACOBINO, J.P. 1995. Modulation of obese gene expression in rat brown and white adipose tissue. *FEBS Lett* 373: 131-134.

MONGET, P.; MARTIN, G. 1997. Involvement of insulin-like growth factors in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Human Reproduction* 12: 33-52.

MORASH, A.; LI, P.R.; MURPHY, M.; WILKINSON, E. 1999. Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 1140(12) 5995-5998.

MORRISON, C.D.; DANIEL, J.A.; HOLMBERG, B.J.; DJIANE, J.; RAVER, N.; GERTLER, A.; KEISLER, D.H. 2001. Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: effects on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. *J Endocrinol.* feb; 168(2): 317-324.

NEDVIDKOVA, J. 1997. Leptin. *Cesk Fysiol* 46: 182-8.

NICKLAS, B.J.; TOTH, M.J.; GOLDBERG, A.P.; POEHLMAN, E.T. 1997. Racial differences in plasma leptin concentrations in obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 315-517.

NONOSHITA, L.D.; WATHEN, N.C.; DESUPIN, B.A.; CHARD, T.; GIUDICE, L.C. 1994. Insulin-like growth factor (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs) in embryonic cavities in early human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 1249-1255. (Medline)

OLIVER, M.H.; HARDING, J.E.; BREIER, B.H.; EVANS, P.C.; GLUCKMAN, P. D. 1993. Glucose but not aminoacids regulates plasma insuline like growth factor (IGF-1) concentrations in fetal sheep. *Pediatr Res* 34: 62-65.

ORBAN, Z.; BORNSTEIN, S.R.; CHROUSOS, G.P. 1998. The interaction between leptin and the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Hormone Metab Res* 30: 231-5.

OVIES, G et al. 1999. leptina y reproducción. *Rev Cubana Endocrinol* 10 (3): 191-197.

PHILLIPS, D.I.; FALL, C.H.; COOPER, C.; NORMAN, R.J.; ROBINSON, J.S.; OWENS, P.C. 1999. Size at birth and plasma leptin concentrations in adult life. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23: 1025-1029.

PIRWANY, I.R.; FLEMING, R.; SATTAR, N.; GREER, I.A.; WALLACE, A.M. 2001. Circulating leptin concentrations and ovarian function in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 145: 289-94.

PIZABARRO, R et al., 1999. Leptina: una hormona secretada por el tejido adiposo. Primer estudio muestra poblacional uruguaya. *Rev Med Uruguay* 1999; 15: 43-48.

POWELL-BAXTRON, L.; HOLLINGSHEAD, P.; GILLET, N.; PITTS.M MEEK. S.; STEWART, T.A. 1993. Gene knockout mice demonstrate that IGF-1 is essential for normal muscle development. *Pediatr Res* 33: 253-257.

REMESAR, X.; RAFECAS, L.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.A.; ALEMANY, M. 1997. Is leptin an insulin counter- regulatory hormone?. *FEBS. Lett* 402: 9-11.

RENTSCH, J.; CHIESI, M. 1996. Regulation of ob gene RNAm levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett*, 379: 55-59.

ROBACZIK, M.; SMIAROWSKA, M.; KRZYZANOWKA-SWINIARSKA, B. 1997. The ob gene product (leptin) – a new hormone of adipose tissue. *Przeg* 54: 348-52.

ROBINSON, J.J.; McDONALD, I.; FRASER, C. y CROFTS, R.M.J. 1977 *J. Agric. Sci.* 88: 539-552

ROBINSON, J.J. 1982. En : *Sheep and Goat Production*. I.E. Coop (Ed.). Elsevier. Amsterdam, Holanda. pp:103-118

ROBINSON, J.S.; OWENS, J.A.; DE BARRO, T.; LOK, F.; CHIDZANJA, A. 1994. Maternal nutrition and fetal growth. In: Ward Rht, Smith, S.K, Donnay, D (eds.), Early fetal growth and development. London: RCOG press 317-329.

ROBINSON, J.; SINCLAIR, K.; McEVOY, T. 1999. Nutritional effects on fetal growth. *Animal Science*. 68: 315-331.

ROHNER-JEANRENAUD, E.; JEANRENAUD, B. 1997. Central nervous system and body weight regulation. *Ann Endocrinol (Paris)* 58: 137-42.

ROSENBAUM, M.; NICOLSON, M.; HIRSCH, J.; HEYMSFIELD, S.B.; GALLAHER, D.; CHU, E. et al. 1996. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3424-7.

ROURY, J.; ANTTILA, L.; KOSKINEN, P.; PENTTILA T.A.; IRJALA, K.; HUUPPONEN, R, et al. 1997. Serum leptin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1697-700.

RUSSELL. 1979. Nutrients requeriments of sheep. Board of agriculture. [Http://www.nap.edu](http://www.nap.edu).

RYAN, A.S Y ELAHI, D. 1996. The effects of acute hyperglycemia and hyperinsulinemia on plasma leptin levels- its relationships with body fat, visceral adiposity, and age in women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81: 4433-4438.

SAGAWA, N et al. 1997. Leptin production by hydatidiform mole. *The Lancet* 350: 1518-1519.

SALADIN, R.; DE VOS, P.; GUERRE-MILLO, M.; LETURQUE, A.; GIRARD, J.; STAELS, B.; AUWERX, J. 1995. Transient increase in obese gene expresión after food intake or insulin administration. *Nature*, 377: 527-529.

SALADIN, R.; STAELS, B.; AUWERX, J Y BRIGGS, M. 1996. Regulation of ob gene expression in rodents and humans. *Hormones and Metabolic Research* 28: 638-641.

SENARIS, R.T.; GARCIA-CABALLERO, X.; CASABIELL, R.; CALLERO, R.; CASTRO, R.V.; CONSIDINE, C.; DIEGUEZ, F.F.; CASANUERA. 1997. Síntesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 138: 4501-4504.

SCHWARTZ, M.W.; BASKIN, D.G.; BUKOWSKI, T.R.; KUIJPER, J.L.; FOSTER, D.; LASSER, G.; PRUNKARD, D.E.; PORTE, D.; WOODS, S.C.; SEELEY, R.J.; WEIGLW, D.S. 1996. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 45: 531-535.

SEGAL, K.R.; LANDT, M.; KLEIN, S. 1996. Relationship between insulin sensitivity and plasma leptin concentration in lean and obese men. *Diabetes* 45: 988-91.

SHARMA, K.; CONSIDINE, R.V. 1998. The ob protein (leptin) and the kidney. *Kidney Int* 53: 1483-7.

SIMON, E.; DEL BARRIO, A.S. 2002. Leptina y obesidad. *Anales Sis San Navarra* 25 (Supl.1): 53-64.

SIMÓN, E.; TRAYHURN, P.; DEL BARRIO, A.S.; PORTILLO, M.P. 1999. Lipid mobilization and serum leptin levels in dietary induced overweight rats. *Eat Weight Dis* 4:33.

SINHA, M.K.; CARO, J.F. 1998. Clinical aspects of leptin. *Vit Hormones*; 54: 1-30.

SMITH-KIRWIN, S.M.; O'CONNOR, D.M.; DE JOHNSTON, E.D.; DE LANCEY, S.G.; HASSINK, V.L. 1998. Funanage, Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1810-1813.

STABENFELDT, G.; EDQVIST, L. 1999. Procesos de la reproducción de la hembra. In. *Fisiología de los animales domésticos*. (eds. H, Dukes; M, Swenson). Mexico, M Aguilar editor S.A. pp 678-711.

SYMONDS, M.; BUDGE, H.; STEPHENSON, T.; MC MILLEN, I. 2001. Fetal endocrinology and development manipulation and adaptation to long term nutritional and environmental challenges. *Reproduction*. 121: 853-862.

TARTAGLIA, L.A. 1997. The Leptin receptor. *J Biol Chem* 272: 6093-6096.

TARTAGLIA, L.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R et al. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor. *Cell* 83: 1263-1271.

THISSEN, J.P.; KETELSLEGERS, J.M y UNDERWOOD, L.E. 1994. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 15: 80-101.

THOMAS, L.; WALLACE, J.M.; AITKEN, R.P.; MERCER, J.G.; TRAYHURN, P.; HOGGARD, N. 2001. Circulating leptin during ovine pregnancy in relation to maternal nutrition, body composition and pregnancy outcome. *J Endocrinol.* Jun; 169(3): 465-476.

THOMSON, A.B.; DE POVER, A.; KEELAN, M.; JAROCKA-CYRТА, E.; CLANDININ, M.T. 1997. Inhibition of lipid absorption as an approach to the treatment of obesity. *Methods Enzymol* 286: 3-44.

TIERNEY, L et al. 2000. Diagnóstico clínico y tratamiento. 35ª Ed. El manual moderno. Cap 26: 1055.

TINDALL, J.; KNAGGS, G.; HART, I.; BLAKE, L. 1978. Release of growth hormone in lactating and non-lactating goats in relation to behaviour, stages of sleep, electroencephalographs, environmental stimuli and levels of prolactin, insulin, glucose and free fatty acids in the circulations. *Journal of Endocrinology* 76: 333-346.

TRAYHURN, P.; THOMAS, M.E.A.; DUNCAN, J.S Y RAYNER, D.V. 1995. Effects of fasting and refeeding on *ob* gene expression in white adipose tissue of lean and obese (*ob/ob*) mice. *FEBS Letters* 368 488- 490.

TRAYHURN, P.; HOGGARD, N.; MERCER, J.G.; RAYNER, D.V. 1998. Hormonal and neuroendocrine regulation of energy balance-the role of leptin. *Arch Tierernahr* 51: 177-85.

TRAYHURN, P.; HOGGARD, N.; MERCER, J.G.; RAYNER, D.V. 1999. Leptin: fundamental aspects. *Int J Obesity* 23 (Suppl 1): 22-28

UTRIAINEN, T.; MALMSTROM, R.; MAKIMATTILA, S.; YKI-JARVINEN, H. 1996. Supraphysiological hyperinsulinemia increases plasma leptin concentrations after 4h in normal subjects. *Diabetes* 45: 1364-6.

VAISSE, C.; HALAAS, J.L.; HORBATH, C.M.; DARNELL, J.E, JR.; STOFFEL, M.; FRIEDMAN, J.M. 1996. Leptin activation of STAT3 in the hypothalamus of wild-type and *ob/ob* mice but not *db/db* mice. *Nature Genet*, 14: 95-97.

VICKERS, M.H.; BREIER, B.H.; CUTFIELD, W.S.; HOFMAN, P.L.; GLUCKMAN, P.D. 2000. Fetal origins of hyperphagia, obesity and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol* 279: E83-E87.

WALLACE, J.M.; BOURKE, D.A.; AITKEN, R.P. 1999. Nutrition and fetal growth: paradoxical effects in the overnourished adolescent sheep. *J Reprod Fertil*, 52: 385-399.

WANG, J.; LIU, R.; HAWKINS, M.; BARZILAI, N Y ROSETTI, L. 1998. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* **393** 684-688

WANG, M.Y.; COYAMA, K.; SHIMABUKURO, M.; MANGELSDORF, D.; NEWGARD, C.B.; UNGER, R.H. 1998. Overexpression of leptin receptors in pancreatic islets of Zucker diabetic fatty rats restores GLUT-2, glucokinase, and glucose-stimulated insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 11921-11926.

WAUTERS, M.; MERTENS, L.; RANKINEN, L.; CHAGNON, M.; BOURCHARD, C.; GALL VAN. 2001. Leptin receptor gene polymorphisms are associated with insulin in obese women with impaired glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3227-32.

WEIGLE, D.S. 1997. Leptin and other secretory products of adipocytes modulate multiple physiological functions. *Ann Endocrinol (Paris)* 58: 132-6.

WILLIAMS, G.L.; AMSTALDEN, M.; GARCIA, M.R.; STANKO, R.L.; NIZIELSKI, S.E.; MORRISON, C.D and KEISLER, D.H. 2002. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 339-349.

WITHERS, D.J. 2001. Insulin receptor substrate proteins and neuroendocrine function. *Biochem Soc Trans* 29: 525-9.

ZHANG, Y.; 1997. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 387(6629): 206-9.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J.M. 1994. Positional cloning of mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-431.