

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE PSICOLOGÍA  
Departamento de Psicobiología



**TESIS DOCTORAL**

**Efecto de la dieta materna restringida e hipercalórica en el estado metabólico y conductual de la descendencia: implicaciones en el sistema endocannabinoide**

**(Effects of restricted and hypercaloric maternal diet on the metabolic and behavioral status of offspring: involvement of endocannabinoid system)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**María Teresa Ramírez López**

Directores

**Raquel Gómez de Heras**  
**Fernando Rodríguez de Fonseca**

**Madrid, 2018**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

Departamento de Psicobiología



**EFFECTO DE LA DIETA MATERNA  
RESTRINGIDA E HIPERCALÓRICA EN EL  
ESTADO METABÓLICO Y CONDUCTUAL DE  
LA DESCENDENCIA: IMPLICACIONES EN EL  
SISTEMA ENDOCANNABINOIDE**

Memoria para optar al grado de doctora presentada por:

**MARÍA TERESA RAMÍREZ LÓPEZ**

Bajo la dirección de los doctores:

**Raquel Gómez de Heras y Fernando Rodríguez de Fonseca**

Madrid, 2017

# **TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN INTERNACIONAL**

Doctorado en Psicología:

Neurociencia Cognitiva y Psicología Experimental



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

Facultad de Psicología

Departamento de Psicobiología

## **EFFECTO DE LA DIETA MATERNA RESTRINGIDA E HIPERCALÓRICA EN EL ESTADO METABÓLICO Y CONDUCTUAL DE LA DESCENDENCIA: IMPLICACIONES EN EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE**

(Effects of restricted and hypercaloric maternal diet on the metabolic and behavioral status of offspring: Involvement of endocannabinoid system)

**MARÍA TERESA RAMÍREZ LÓPEZ**

Directores:

**Raquel Gómez de Heras y Fernando Rodríguez de Fonseca**

**Madrid, 2017**



*“Lo que caracteriza  
al hombre de la ciencia  
no es la posesión del conocimiento o  
de verdades irrefutables,  
sino la búsqueda desinteresada e  
incesante de la verdad”*

*Karl Popper*



*A Marta y David,  
porque vuestra felicidad  
me inspira y motiva para superarme día a día.*

*A Jorge,  
por compartir mis alegrías y  
sufrir mis frustraciones.*





# AGRADECIMIENTOS

Embarcarse en un proyecto tan ambicioso, como el que supone realizar una tesis doctoral en un “momento crítico” de la vida, puede parecer a priori un objetivo inalcanzable y/o arriesgado. Ha sido un largo camino en el que se ha hecho imprescindible sacar a flote grandes dosis organización, esfuerzo, constancia y paciencia, y donde la ilusión, motivación e implicación en un proyecto en el que creía totalmente, han resultado de gran ayuda. Ha sido preciso realizar importantes sacrificios. Ha habido obstáculos en este proceso, momentos de cansancio infinito, de incertidumbre y frustraciones. Pese a ello, hoy creo que todo el esfuerzo ha merecido la pena y he logrado crecer personal, profesional y científicamente a lo largo de este tiempo. Este camino no se ha realizado en solitario. Muchos han sido los que me acompañado. Entre ellos están los que han compartido mi día a día y, por supuesto, los que han trabajado directamente conmigo. También los que con sus ánimos me han apoyado. Éste es el mejor momento que hay para agradecer a todos su contribución. Todos ellos han sido claves para lograrlo, sobre todo en los momentos complicados de esta tesis.

Quiero empezar dando las gracias a **mi familia**, por el gran apoyo mostrado durante este tiempo. Aunque en algunos momentos ha podido resultarles difícil entender todo el tiempo que he tenido que invertir en este proyecto, han sabido aceptar mis decisiones y encajar todo mi trabajo y sacrificios de forma natural. Gracias en especial a mi “gran” pequeña **Marta**, esa gran descubridora, conversadora incansable y divertida. Porque siendo muy pequeña has mostrado una madurez increíble, porque has comprendido lo importante que era para mí “la tesis”, teniendo constancia de ella desde tus primeros recuerdos, y has aprendido a respetar mi trabajo y también el valor del esfuerzo y la constancia. A mi pequeño **David**, por acompañarme desde el principio de tu vida y regalarme tus primeras sonrisas, balbuceos y pasitos a la par que se completaban las diferentes partes de esta tesis. Por tu gran tenacidad para lograr los importantes hitos del desarrollo, que nos transmite a diario una lección de

superación y aprendizaje. Gracias a **Jorge**, por estar siempre a mi lado, aún en los momentos complicados, y por enorgullecerte de mis logros, los cuales también son tuyos. Vosotros sois lo mejor que tengo y lo que me inspira para intentar dar lo mejor de mí misma en los proyectos en los que me implico. Gracias a **mi madre, Emilia**, por ayudarme con los niños cuando más lo necesito, ayuda sin la cual esta tesis difícilmente hoy estaría acabada, y por su eterno apoyo incondicional. A **mis suegros, Pablo y Sole**, por su continua disposición para echar una mano, apoyar y contribuir a normalizar las situaciones extraordinarias, tales como lo fue la estancia predoctoral en Mainz. A mis **hermanos (Patri y Carlos), cuñados, tíos (Angelita y Julián)**, por sus siempre animosas palabras y también a los pequeños sobrinos (**Carla, Enma y Carlos**). Gracias por vuestro apoyo constante.

Quiero agradecer a **mis directores** de tesis, **Raquel y Fernando**, por aceptarme a mí y a mis circunstancias y darme la oportunidad de iniciar una nueva línea de investigación en el laboratorio, que encajaba a la perfección con mi formación e intereses. Gracias por darme libertad para pensar, para hipotetizar, para analizar, para escribir, para acertar y para equivocarme. Creo que a lo largo de esta tesis he podido participar activamente y aprender a lo largo de todo el proceso de investigación, que implica desde el diseño de un proyecto hasta el culmen que supone la redacción de los artículos científicos. Muchísimas gracias por ello.

Específicamente a mi directora, **Raquel**, gracias por guiar mis pasos desde los primeros años de carrera y darme la oportunidad de iniciarme en la investigación en el grupo de Neurofarmacología del comportamiento motivado. Gracias también por el refuerzo constante del trabajo realizado.

A mi director, **Fernando**, porque tu brillantez, perseverancia y honestidad ha conseguido motivarme hasta el infinito. Gracias por el apoyo mostrado en los momentos más críticos de esta tesis, por la ayuda inestimable en la preparación y publicación de los artículos, y por aportar un sello de calidad en todo lo realizado.

A mis compañeros del **grupo de Neurofarmacología del comportamiento motivado** y muy especialmente al **grupo de “becarios precarios”**. Entre ellos quiero destacar la ayuda, paciencia, ánimos y amistad que **Mariam** me ofreció, siendo sumamente importantes para lograr parte de los resultados de esta tesis. Mil gracias

por ello. También quiero realzar la colaboración de **Noemí, Patxi, María y Dani Ouro**. A **Isa** por su siempre apoyo emocional y amistad. Y también a **Nerea, Sara, Víctor, Nuria e Inma**, sin olvidar a las nuevas generaciones. **Antonio y Alicia**. Gracias a todos por compartir a lo largo de este tiempo espacios de trabajo, experiencias de enseñanza y aprendizaje, junto con interesantes debates, bromas, preocupaciones, risas, y/o comidas “de empresa”. Quiero también resaltar la labor de las personas que han hecho posible lo imposible en el laboratorio, con su apoyo material, técnico-informático, ambiental y personal, en especial **Ana, Luis y Pilar**.

Gracias a los colaboradores de proyecto del **instituto Ibima** y muy en especial a **Juan Suárez** por su gran contribución en la preparación, revisión, redacción y comentarios críticos de gran parte de los artículos derivados de esta tesis. Gracias a **Rocío Arco**, por su intensivo trabajo con las muestras, implicación en el proyecto y la comunicación fluida que hemos mantenido en este tiempo. También quiero destacar el trabajo realizado por **Juan Decara**, que junto con Rocío, ha posibilitado una parte del análisis bioquímico con una actitud abierta y dispuesta a la total cooperación.

I would like also to express my gratitude to Professor **Beat Lutz**, for giving me the opportunity to stay in his lab and analyze part of the samples which are included in this thesis. I am also grateful for his useful advice during the process of publishing the manuscripts. Thanks to the whole research group of the **Institut für Physiologische Chemie** of **Johannes Gutenberg Universität (Mainz)** because they made me feel like I was part of the team during my short stay (Scientists, Ph. doctor, diploma and master students, technical and lab assistants, secretary). Special thanks to **Laura Bindila** and **Clementine Hofmann** for their material and didactic support during this time. Grazie mille and Vielen Dank to **Linda Lomazzo** and **Claudia Schwitter**, for their help and kindness while measuring endocannabinoids and/or the preparation of articles included in this thesis. Gracias también a todos los que contribuyeron a que mi experiencia en Mainz fuera altamente positiva, ofreciéndome su amistad y/o ayuda en situaciones cotidianas (**Raquel, Damien, Zazu, Inma, Daniel**).

Quiero también hacer una especial mención a los científicos que he ido conociendo en este tiempo y que me han aportado valiosos consejos de forma desinteresada. En

especial gracias a **Javier Pavón, Toñi Serrano, Patricia Rivera, Eva Marco, Laura Orio y María Gómez.**

A mis **amigos**, los de siempre y los que se van uniendo a nuestras vidas (**Noemí y Luis, César y Elena, Inma, Virginia, Irene, Ana T y Sergio, Jesús, Marta, Teresa y Mario...**, junto con los “retoñines” que vamos viendo nacer y crecer). También a mis vecinos **Alfonso y Manoli**, su estupenda familia (hijos y nietos) y a **Rosa**, por su ánimos continuos.

Quiero destacar la labor de **mis profesores**, los que a lo largo de mi vida académica han reforzado positivamente la curiosidad intelectual y el pensamiento crítico, contribuyendo así a forjar mi interés por la ciencia. Muy en especial a mis profesores de la **Facultad de Psicología de la Universidad Complutense**, donde el reconocimiento al esfuerzo se convirtió en mi oportunidad para poder dedicarme en exclusiva a la investigación durante un tiempo.

A **todas las madres** que intentan ofrecer el mejor futuro posible a sus hijos. Esta tesis se inspira en todas ellas. Muy en especial a las madres trabajadoras que lidian por conciliar lo mejor posible trabajo, casa y crianza de los niños. Entre ellas están las mamás con las que he compartido mi día a día estos años de tesis, las **mamás de Piruetas** y las del **colegio Mirasur** (**Natalia, Mamen, Sole, Teresa, Sonia, Soraya...**), con un guiño especial a sus niños, a los que queremos ver crecer de la mejor manera posible. Gracias también a esos papás, con los que me encuentro a diario, y que cada día están más implicados en el cuidado y educación de los hijos.

Quiero también agradecer a mis **compañeros** del **Hospital Universitario de Getafe**, hospital donde nació mi vocación investigadora, por acogerme de nuevo tras un periodo de tiempo dedicado a la tesis. En especial muchas gracias a todos los compañeros **del paritorio y de la planta de Obstetricia y Ginecología** (todo el equipo de **matronas, enfermeras, auxiliares, ginecólogos, celadores**) con los que he coincidido desde el año 2002, compartiendo innumerables anécdotas y aventuras “obstétricas”, y que además siempre ensalzan mi interés por la investigación.

Al **Ministerio de Educación**, porque gracias a la financiación recibida con la beca predoctoral FPU y la oportunidad brindada de realizar una estancia breve, ha hecho posible lograr los resultados que se exponen en esta tesis.

A las **mujeres y a los bebés** que atendí y a los que atenderé. Porque vosotros sois los que dais sentido a esta investigación.

*¡Muchísimas gracias!*



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

---

<b>RESUMEN.....</b>	<b>5</b>
---------------------	----------

---

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>9</b>
----------------------	----------

---

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
--------------------------	-----------

---

<b>1. EL ESTADO NUTRICIONAL MATERNO Y LA PROGRAMACIÓN NUTRICIONAL.....</b>	<b>15</b>
1.1. Necesidades nutricionales durante el desarrollo humano.....	15
1.2. La ganancia ponderal durante la gestación.....	18
1.3. Concepto de programación nutricional.....	21
1.4. Enfermedades que se originan en estadios iniciales del desarrollo.....	26
1.5. La utilidad de los modelos animales para estudiar el fenómeno de la programación nutricional.....	30
<b>2. EFECTO DE LAS DIETAS MATERNAS RESTRINGIDAS E HIPERCALÓRICAS EN LA PROGRAMACIÓN METABÓLICA Y CONDUCTUAL: MECANISMOS BIOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN EL PROCESO.....</b>	<b>33</b>
2.1 Artículo 1.....	33
<i>El papel de la dieta materna en la programación metabólica y conductual: Revisión de los mecanismos biológicos implicados .....</i>	<i>33</i>
<b>3. EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE: PAPEL EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO.....</b>	<b>49</b>
3.1. Concepto del sistema endocannabinoide.....	49

3.2. Ligandos endógenos del sistema endocannabinoide: síntesis y degradación.....	50
3.3. Receptores cannabinoides.....	53
3.4. Funciones del sistema endocannabinoide.....	54
3.5. Papel del sistema endocannabinoide en el metabolismo energético.....	55
3.5.1 Mecanismos centrales de regulación del metabolismo energético.....	55
3.5.1.1 El hipotálamo.....	56
3.5.1.2 El sistema límbico.....	58
3.5.1.3 El bulbo olfatorio.....	59
3.5.1.4 El núcleo del tracto solitario.....	60
3.5.2 Mecanismos periféricos de regulación del metabolismo energético.....	61
3.5.2.1 Tejido adiposo.....	61
3.5.2.2 Páncreas.....	62
3.5.2.3 Hígado.....	63
3.5.2.4 Músculo esquelético.....	63
3.5.2.5 Tracto gastrointestinal.....	64
3.5.2.6 Sistema nervioso vegetativo.....	65
4. POSIBLE PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LA PROGRAMACIÓN METABÓLICA Y CONDUCTUAL.....	67
4.1 El sistema endocannabinoide y el desarrollo perinatal.....	67
4.1.1 La señalización cannabinoide durante la gestación.....	67
4.1.2 El sistema endocannabinoide en el periodo postnatal precoz.....	70
4.1.3 El sistema endocannabinoide como factor importante en el desarrollo cerebral.....	71
4.1.3.1 Niveles de endocannabinoides durante el desarrollo cerebral.....	72
4.1.3.2 Receptores cannabinoides en el desarrollo cerebral.....	73
4.1.3.3 Destino celular y supervivencia.....	73
4.1.3.4 Proliferación, diferenciación y neurogénesis.....	74
4.1.3.5 Migración.....	75
4.1.3.6 Elongación de neuritas.....	75
4.1.3.7 Sinaptogénesis.....	76
4.1.4 Evidencias de alteración en el sistema endocannabinoide tras la exposición perinatal a estímulos adversos.....	77
4.2 Influencia de los estímulos nutricionales en el sistema endocannabinoide.....	80
4.3 Papel del sistema endocannabinoide en la génesis de obesidad y síndrome metabólico.....	84
4.4 Relación del sistema endocannabinoide con los trastornos neuropsiquiátricos y alteraciones conductuales.....	86
4.5 Conclusiones.....	89
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>91</b>



## MATERIAL Y MÉTODOS.....95

---

1. DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL.....	97
1.1 Evaluación del efecto de la dieta materna restringida implementada durante el periodo perinatal.....	97
1.1.1 Modelo de restricción calórica materna tipo 1 (R1): Restricción calórica preconcepcional y gestacional.....	97
1.1.2 Modelo de restricción calórica tipo 2 (R2): Restricción calórica gestacional.....	99
1.2 Evaluación del efecto de la dieta hipercalórica implementada durante el periodo perinatal.....	99
1.2.1 Modelo de dieta materna hipercalórica/altamente palatable (P).....	100

## RESULTADOS.....105

---

1. EFECTO DE LA DIETA MATERNA RESTRINGIDA.....	107
1.1 Efecto de la restricción calórica implementada durante el periodo preconcepcional y gestacional: Impacto en los niveles de endocannabinoides al nacimiento de la descendencia.....	109
1.1.1 Artículo 2 .....	109
<i>Maternal caloric restriction implemented during the preconceptional and pregnancy period alters hypothalamic and hippocampal endocannabinoid levels at birth and induces overweight and increased adiposity at adulthood in male rat offspring. ....</i>	109
1.1.2 Datos complementarios al artículo 2.....	126
1.1.2.1 Ingesta nutricional durante la gestación y lactancia.....	126
1.1.2.2 Impacto de la restricción calórica en la adiposidad materna al destete.....	127
1.1.2.3 Efecto de la dieta materna restringida en las respuestas conductuales de la descendencia hembra.....	127
1.1.2.3.1 Evaluación de las conductas relacionadas con la ansiedad en la descendencia hembra.....	127
1.1.2.3.2 Evaluación de la conducta motora en la descendencia hembra.....	127
1.2 Efecto de la dieta materna restringida durante el periodo preconcepcional y gestacional: Impacto en el sistema endocannabinoide de la descendencia en la etapa adulta.....	129
1.2.1 Artículo 3.....	129
<i>Long-term effects of prenatal exposure to undernutrition on cannabinoid receptor-related behaviors: Sex and tissue-specific alterations in the mRNA expression of cannabinoid receptors and lipid metabolic regulators.....</i>	129

1.2.2	Datos complementarios al artículo 3.....	148
1.3	Efecto de la restricción calórica materna implementada durante la totalidad de la gestación: impacto en los niveles de endocannabinoides al nacimiento.....	153
1.3.1	Artículo 4.....	153
	<i>A moderate diet restriction during pregnancy alters the levels of endocannabinoids and endocannabinoid-related lipids in the hypothalamus, hippocampus and olfactory bul of rat offspring in a sex-specific manner. ....</i>	<i>153</i>
2.	<b>EFFECTO DE LA DIETA MATERNA HIPERCALÓRICA ALTAMENTE PALATABLE.....</b>	<b>175</b>
2.1.	<b>Efecto de la dieta materna hipercalórica: Impacto en los niveles de endocannabinoides de la descendencia al nacimiento.....</b>	<b>177</b>
2.1.1	Artículo 5.....	177
	<i>Exposure to a highly caloric palatable diet during pregestational and gestational periods affects hypothalamic and hippocampal endocannabinoid levels at birth and induces adiposity and anxiety-like behaviors in male rat offspring.....</i>	<i>177</i>
2.1.2	Datos complementarios al artículo 5.....	193
2.1.2.1	Material suplementario del artículo 5.....	193
2.1.2.2	Impacto de la dieta materna hipercalórica en parámetros relacionados con la fertilidad.....	195
2.1.2.3	Efecto de la dieta materna hipercalórica altamente palatable en los niveles cerebrales de endocannabinoides y N-aciletanolaminas en el bulbo olfatorio de las crías macho.....	196
2.1.2.4	Efecto de la dieta materna hipercalórica en las respuestas conductuales de la descendencia hembra.....	197
2.1.2.4.1	Evaluación de las conductas relacionadas con la ansiedad en la descendencia hembra.....	197
2.1.2.4.2	Evaluación de la respuesta locomotora en la descendencia hembra.....	198
2.2	<b>Efecto de la dieta materna hipercalórica: Impacto en el sistema endocannabinoide de la descendencia en la etapa adulta.....</b>	<b>199</b>
2.2.1	Artículo 6.....	199
	<i>Exposure to a highly caloric palatable diet during the perinatal period affects the expression of the endogenous cannabinoid system in the brain, liver and adipose tissue of adult rat offspring.....</i>	<i>199</i>
2.2.2	Datos complementarios al artículo 6.....	233

## DISCUSIÓN INTEGRADORA.....235

1. LAS DIETAS MATERNAS INADECUADAS (DIETA RESTRINGIDA Y/O HIPERCALÓRICA) ALTERAN LA GESTACIÓN Y SUS PRODUCTOS PERINATALES.....239
  - 1.1 Afectación sutil de los parámetros de fertilidad tras la exposición a dietas maternas inadecuadas en el periodo preconcepcional: posible impacto en la nutrición histiotrófica.....239
  - 1.2 Afectación de la ganancia de peso materna tras la exposición a dietas maternas inadecuadas.....241
  - 1.3 Alteración de los resultados neonatales y/o supervivencia de las crías tras la exposición a dietas maternas inadecuadas.....244
2. LA EXPOSICIÓN A DIETAS MATERNAS INADECUADAS (DIETA RESTRINGIDA Y/O HIPERCALÓRICA) ALTERA LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO Y METABÓLICOS DE LA DESCENDENCIA.....246
3. LA EXPOSICIÓN A DIETAS MATERNAS INADECUADAS (DIETA RESTRINGIDA Y/O HIPERCALÓRICA) INCREMENTA EL RIESGO DE DESARROLLAR CONDUCTAS ALTERADAS EN LA DESCENDENCIA.....251
  - 3.1 La exposición a dietas maternas inadecuadas (dieta restringida y/o hipercalórica) se asocia a un fenotipo ansioso en etapas posteriores de la vida.....252
  - 3.2 La exposición a dietas maternas inadecuadas (dieta restringida y/o hipercalórica) altera la conducta de la ingesta de la descendencia.....254
4. AFECTACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN DIFERENTES MOMENTOS DEL CICLO VITAL EN LA DESCENDENCIA SOMETIDA A DIFERENTES DIETAS MATERNAS.....257
  - 4.1 La exposición a dietas maternas inadecuadas (dieta restringida y/o hipercalórica) altera los niveles de endocannabinoides y/o lípidos relacionados cerebrales en la descendencia al nacimiento.....259
  - 4.2 La exposición a dietas maternas inadecuadas (dieta restringida y/o hipercalórica) altera la expresión de genes de diferentes componentes del sistema endocannabinoide en tejidos metabólicamente relevantes.....267
5. DIMORFISMO SEXUAL EN LA DESCENDENCIA SOMETIDA A DIFERENTES DIETAS MATERNAS EN EL PERIODO PERINATAL.....274
6. SIMILITUDES Y DIFERENCIAS ENTRE LOS MODELOS DE DIETA MATERNA INADECUADA ESTUDIADOS.....274
7. IMPLICACIONES CLÍNICAS Y PARA FUTURAS INVESTIGACIONES.....275

## CONCLUSIONES.....277

**CONCLUSIONS.....279**

---

**REFERENCIAS.....281**

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## INTRODUCCIÓN

### Figuras:

<i>Figura 1.</i> Odds ratio para el desarrollo de síndrome metabólico según el peso al nacimiento.....	22
<i>Figura 2.</i> Hipótesis del fenotipo ahorrador. ....	24
<i>Figura 3.</i> Factores relacionados con el desarrollo de la obesidad y otros trastornos. ....	47
<i>Figura 4.</i> Estructura química de los principales endocannabinoides.....	50
<i>Figura 5.</i> Síntesis de Anandamida. ....	51
<i>Figura 6.</i> Síntesis de 2-AG. ....	52
<i>Figura 7.</i> Efecto central de la sobreactivación del sistema endocannabinoide en el equilibrio energético. ....	60
<i>Figura 8.</i> Efecto periférico de la sobreactivación del sistema endocannabinoide en el equilibrio energético....	66
<i>Figura 9.</i> Estadios críticos del desarrollo donde el sistema endocannabinoide (SEC) juega un importante papel.....	70
<i>Figura 10.</i> Acción de la señalización cannabinoide durante el desarrollo cerebral. Mecanismos propuestos.....	77
<i>Figura 11.</i> Alteración de la conectividad sináptica por una mala programación materna. ....	78
<i>Figura 12.</i> Implicación del sistema endocannabinoide en la patofisiología del síndrome metabólico.....	86

### Tablas:

Tabla 1. Ingesta dietética de referencia de macronutrientes y algunas vitaminas y elementos para mujeres adultas entre 19-49 años.....	16
Tabla 3. Ganancia de peso recomendada durante la gestación según el IMC pregestacional.....	20
Tabla 4. Criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico .....	29

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Figuras:

<i>Figura 13.</i> Características nutricionales de la dieta estándar empleada en este estudio .....	99
<i>Figura 14.</i> Características nutricionales de la mezcla de chocolates comerciales empleada en este estudio ....	100
<i>Figura 15.</i> Porcentaje de azúcares simples y grasas saturadas de las dietas empleadas en el estudio.....	101
<i>Figura 16.</i> Implementación de las dietas maternas en los tres modelos estudiados durante el periodo perinatal (pregestación, gestación y lactancia).. ..	102
<i>Figura 17.</i> Seguimiento de la descendencia tras el destete.....	103



## ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidónico

Acetil-CoA: Acetil-coenzima A

*Acaca*: Gen de acetil-coenzima A carboxilasa alfa

*Acox1*: Gen de la acetil-coenzima A oxidasa 1

ACV: Accidente cerebrovascular

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AEA: Anandamida

2-AG: 2-araquidonilglicerol

ALKP: Fosfatasa alcalina

ALT: Aminotransferasa alanina

Apo A-I: Apolipoproteína A-I

ARN: Ácido ribonucleico

AST: Aminotransferasa aspartato

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

C: Dieta control. Madres y descendencia asignada a dieta estándar

CC: Descendencia cuyas madres estuvieron expuestas a dieta control (C) y que fueron destetadas con dieta estándar

CB<sub>1</sub>: Receptor cannabinoide tipo 1

CB<sub>2</sub>: Receptor cannabinoide tipo 2

*Chrebp*: Gen de la proteína de unión a elementos de carbohidratos

*Cnr1*: Gen del receptor cannabinoide tipo 1

*Cnr2*: Gen del receptor cannabinoide tipo 2

*Cpt1a,b*: Genes de carnitina palmitoiltransferasa 1a,b

*Cox4i1*: Gen del citocromo-C oxidasa, subunidad 4I1

DAGL: Diacilglicerol lipasa

*Dagla/Daglb*: Genes de la diacilglicerol lipasa alfa/beta

DOHaD: *Developmental Origins of Health and Disease Hypothesis*, o hipótesis del origen del desarrollo de la salud y enfermedad en los procesos de desarrollo

ECS: *Endocannabinoid system*, sistema endocannabinoide en inglés.

FAAH: Amidohidrolasa de ácidos grasos

*Faab*: Gen de la amidohidrolasa de ácidos grasos

*Fasm*: Gen de la ácido graso sintasa

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GLUT4: Proteína transportadora de la glucosa 4

HDL: *High-density lipoprotein*, lipoproteína de alta densidad

*Hmger*: Gen de 3-hidroxi-3-metilglutaryl Coenzima-A reductasa

HPA: Referida al eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal

HTA: Hipertensión arterial

IL-6: Interleuquina 6

*Insig1,2*: Gen inducido por insulina (1,2)

IOM: *Institute of Medicine*, Instituto de Medicina Americano

LC/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

LC-PUFAs: Siglas en inglés de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

LDL: Lipoproteína de baja densidad

MAGL: Monoacilglicerol lipasa

*Mgll*: Gen de la monoacilglicerol lipasa

MAPK: Proteína kinasa activada por mitógenos

miARN: MicroARN

MRM: *Multiple reaction monitoring* en inglés, monitorización de reacción múltiple

NAE: N-aciletanolamina



NAPE: N-acilfosfatidiletanolamina

NAPE-PLD: N-araquidonil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa

*Napepld*: Gen de la N-araquidonil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa

NPY: Neuropeptido Y

OEA: Oleoiletanolamida

OMS: Organización mundial de la salud

P: Dieta hipercalórica, altamente palatable. Madres o descendencia expuestas a esta dieta

PA: Presión arterial

PC: Descendencia de las madres expuestas a la dieta hipercalórica, altamente palatable, destetadas con dieta estándar

*PCK1*: Gen del fosfoenolpiruvato carboxilquinasa

PAT: Perirenal adipose tissue en inglés, tejido adiposo perirrenal

PEA: Palmitoiletanolamida

PN O: Día postnatal 0 ó día del nacimiento

POMC: Proopiomelanocortina

PPAR $\alpha$ /g: Receptor activado por proliferación de peroxisomas alfa/gamma

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

R1: Restricción tipo 1. Dieta de restricción al 20% durante el periodo preconcepcional y gestacional. Madres o descendencia expuestas a esa dieta

R2: Restricción tipo 2. Dieta de restricción al 20% durante el periodo gestacional. Madres o descendencia expuestas a esa dieta

RC: Descendencia de las madres expuestas a la dieta restringida tipo 1 (R1) destetada con dieta estándar

RNA: Ácido ribonucleico

*Scd1*: Gen de la esteroil coenzima-A desaturasa 1

SEC: Sistema endocannabinoide

SNC: Sistema nervioso central

*Srebf1,2*: Genes de los factores de transcripción elemento de unión regulador de esteroides 1 y 2. En inglés *Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1, 2*

THC: Delta-9-tetrahidrocannabinol

TIC: Test de ingesta compulsiva, en inglés *Compulsive Feeding test*

*Ucp1*: Gen de la proteína desacoplante mitocondrial 1

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

$\gamma$ GT: Gamma-glutamil transpeptidasa

## RESUMEN

### **EFFECTO DE LA DIETA MATERNA RESTRINGIDA E HIPERCALÓRICA EN EL ESTADO METABÓLICO Y CONDUCTUAL DE LA DESCENDENCIA: IMPLICACIONES EN EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE**

La exposición a condiciones nutricionales adversas en periodos críticos del desarrollo, puede favorecer el desarrollo de alteraciones metabólicas o conductuales en etapas posteriores de la vida a través de un proceso denominado programación nutricional. Investigar los mecanismos biológicos que están envueltos en este fenómeno resulta una estrategia útil para entender la complejidad del fenómeno. El sistema endocannabinoide (SEC), implicado en el neurodesarrollo y en la regulación del metabolismo energético y de las respuestas emocionales, podría estar también involucrado en este proceso. Por tanto, en la presente investigación se planteó como objetivo estudiar los efectos de la dieta materna restringida e hipercalórica en: los resultados perinatales, los parámetros metabólicos y conductuales de la descendencia de ambos sexos, así como su impacto en el SEC de los descendientes en diferentes momentos del ciclo vital. Específicamente, 35 ratas Wistar hembra fueron asignadas a dieta control (C), expuestas a dieta estándar durante el periodo perinatal (pregestación, gestación y lactancia); dieta restringida (R1), con una restricción calórica del 20% durante el periodo preconcepcional y hasta el día 20 de la gestación; y/o dieta hipercalórica/altamente palatable (P), expuestas a una libre elección entre una dieta estándar y una dieta rica en grasas saturadas hecha a base de chocolates comerciales durante todo el periodo perinatal. Adicionalmente, 11 ratas hembras Wistar fueron expuestas durante la gestación completa a dieta estándar o a restricción calórica del 20% (R2). Se monitorizó la ganancia ponderal e ingesta calórica de las madres durante el periodo de estudio. Al nacimiento, se evaluaron el tamaño de la camada y el peso corporal de las crías, así como los niveles de los principales endocannabinoides, anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG), ácido araquidónico (AA) y n-aciletanolaminas (NAEs), Oleiletanolamida (OEA) y palmitoiletanolamida (PEA), en el hipotálamo, hipocampo y bulbo olfatorio de las crías macho de las madres C, R1 y P, y en las crías macho y hembra de la condición R2 y sus respectivos controles. Los descendientes de ambos sexos

procedentes de las condiciones C, R1, y P, fueron destetados con una dieta estándar, siendo monitorizados en la ganancia de peso e ingesta calórica hasta la etapa adulta. A lo largo del periodo adolescente y adulto, se evaluaron las respuestas relacionadas con la ansiedad, la respuesta locomotora y la conducta de la ingesta de la descendencia, incluyendo la preferencia por una comida altamente palatable y la respuesta ante el antagonista del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> AM251. Además, al sacrificio de estos animales (5º mes postnatal), se estudiaron la adiposidad, los niveles de metabolitos plasmáticos, la leptinemia, así como la expresión de ARNm de genes del SEC y genes relacionados con el metabolismo lipídico en hígado, tejido adiposo perirenal (PAT) y/o hipotálamo. Los resultados mostraron que las madres R1, R2 y P presentaron alteraciones en la ganancia ponderal y/o ingesta calórica durante el periodo de estudio. Al nacimiento, se encontraron cambios en el tamaño de la camada y/o peso corporal de las crías R1, R2 y P. En las crías machos de la descendencia R1 y P, se hallaron niveles reducidos de los endocannabinoides, AA y/o PEA en el hipotálamo e hipocampo. En la descendencia R2 de ambos sexos se encontró en el hipotálamo disminución en los niveles de endocannabinoides, AA y/o NAEs, hallándose lo opuesto en el hipocampo. Las hembras R2 además mostraron menores niveles de endocannabinoides y lípidos relacionados en el bulbo olfatorio, no encontrándose ningún cambio significativo en esta estructura en los machos expuestos a las dietas R1, P y R2. Tras el destete, los animales expuestos a dietas R1 y P, exhibieron modificaciones de los parámetros corporales y mayor adiposidad, junto con alteraciones plasmáticas compatibles con características del síndrome metabólico (aumento en el colesterol LDL, disminución del colesterol HDL e hiperleptinemia), encontrándose en general mayor afectación en la descendencia macho. La descendencia P además presentó hiperfagia en distintos momentos del ciclo vital. Por otra parte, los descendientes de las madres P y R1 mostraron más conductas relacionadas con la ansiedad que los controles y alteraciones en la conducta de la ingesta tras la administración del AM251, siendo este efecto más acentuado en el caso de los machos y en los expuestos a la dieta P, que además presentaron una menor preferencia por la comida altamente palatable. En referencia a la expresión génica, la descendencia P y R1 exhibió alteraciones en la expresión de genes relacionados con el sistema endocannabinoide en hipotálamo, hígado, y PAT, asociados a alteraciones en la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico en hígado y/o PAT, tanto en machos como en hembras. Particularmente en el hipotálamo, los descendientes R macho junto con las hembras P, mostraron aumento en la expresión de mRNA codificantes para los receptores *Cnr1* y/o *Cnr2*. Además, tanto la descendencia R

como P presentó una regulación a la baja de las enzimas de metabolización del SEC (*Faah*, *Dagl*, *Mgl1*) en el hígado y PAT, siguiendo un patrón diferencial según el sexo. Estas afectaciones fueron más extensas en la descendencia R1, las cuales además se acompañaron de alteraciones en la expresión de ARNm de genes relacionados con el metabolismo lipídico y del colesterol en el hígado (*Cpt1a*, *Fasn*, *Acaca*, *Acox*, *Insig1*, *Hmgcr*, *Ppara*, *Pparγ*) y/o PAT (*Cpt1b*, *Acox1*, *Pparγ*). En conjunto los datos muestran que las dietas maternas restringidas e hipercalóricas pueden modificar los resultados perinatales y alterar parámetros del metabolismo y respuestas conductuales en la descendencia de forma diferencial según el sexo, estando los cambios asociados a modificaciones en el sistema endocannabinoide al nacimiento y/o etapa adulta. Por tanto, los resultados ensalzan la importancia del sistema endocannabinoide en la programación y sugieren que continuar la investigación en este campo, así como la implementación de medidas preventivas en periodos críticos, que incluyan la pregestación, junto con la detección precoz de la descendencia con vulnerabilidad para el desarrollo de trastornos metabólicos y/o conductuales, podrían ser estrategias acertadas para hacer frente a una mala programación.



## ABSTRACT

### **EFFECTS OF RESTRICTED AND HYPERCALORIC MATERNAL DIET ON THE METABOLIC AND BEHAVIORAL STATUS OF OFFSPRING: INVOLVEMENT OF ENDOCANNABINOID SYSTEM**

The exposure to adverse nutritional conditions in critical periods of development can increase the vulnerability to develop metabolic and behavioral alterations later in life, through a process known as nutritional programming. Investigating the underlying mechanism involved in this phenomenon has been considered a useful strategy to understand its complexity. The endocannabinoid system (ECS), which plays an important role on neurodevelopment and on the regulation of energy balance and emotional responses, might be involved in the programming process. Therefore, we aimed to study the impact of a restricted or hypercaloric maternal diet on the perinatal outcomes, metabolic and behavioral parameters of the offspring of both sexes, as well as their impact on the ECS at different stages of development. Accordingly, 35 female Wistar rats were assigned to a control diet (C), where rats were exposed to standard chow during the preconceptional, gestational and lactation periods; preconceptional and gestational restricted diet (R1), where rats were exposed to a 20% calorie-restricted diet during the preconceptional period up until gestational day 20; or a hypercaloric/highly palatable diet, in which rats were given a free choice between standard chow and a high fat containing commercial chocolate mixture diet during pregestation, gestation and lactation. An additional experiment was carried out in 11 female Wistar rats exposed during the entire pregnancy either to standard chow or a 20% calorie-restricted diet (R2). Weight gain and caloric intake of dams were monitored during the studied period. At birth, the litter size and body weight of the pups were assessed. Moreover, the levels of the main endocannabinoids, anandamide (AEA) and 2-arachidoylglycerol (2-AG), arachidonic acid (AA) and N-acylethanolamines (NAEs), Oleylethanolamide (OEA) and Palmitoylethanolamide (PEA), were measured in the hypothalamus, hippocampus and olfactory bulb of male newborn offspring from C, R1 and P dams, and of the male and female newborn offspring from R2 dams and their respective controls. Subsequently, C, R1

and P offspring of both sexes weaned on standard chow diet, were observed until adulthood. Specifically, the evolution on body weight and caloric intake was monitored until the 5° postnatal month. During adolescence and adulthood, the anxiety-related responses, the locomotor activity and feeding behavior, including the preference for a highly palatable food and the response to a cannabinoid receptor antagonism with AM251, were assessed. At sacrifice (5° postnatal month), adiposity, the levels of plasmatic metabolites and leptinemia together with the RNAm levels of endocannabinoid system and lipid metabolism-related genes in the liver and perirenal adipose tissue (PAT) and/or hypothalamus were evaluated. The results showed that rat dams exposed to R1, R2 and P displayed alterations in weight gain and/or caloric intake during the studied period. At birth, modifications in litter size and/or pup body weights were found in all the assessed models of inadequate maternal diet. R1 and P male offspring exhibited decreased endocannabinoid (AEA or 2-AG), AA and/or NAE (PEA) levels in the hypothalamus and hippocampus. The male and female R2 offspring also displayed reduced content of endocannabinoids, AA and/or NAEs (OEA or PEA) in the hypothalamus, whereas the opposite was found in the hippocampus. Moreover, the female R2 offspring showed decreased levels of AEA, AA and PEA in the olfactory bulb, but no modifications were found in this brain region in male offspring exposed to R1, R2 and P. After weaning, the animals exposed to R1 and P, monitored until adulthood, exhibited alterations in growing parameters and higher adiposity, besides plasmatic metabolite alterations indicating metabolic syndrome features (increased LDL cholesterol, decreased HDL cholesterol and hyperleptinemia), which were more apparent in the male offspring. These alterations were accompanied by hyperphagia at different stages of their life in P offspring. Furthermore, R1 and P offspring showed increased anxiety-related responses than control offspring and alterations in feeding behavior after the administration of AM251. These effects were stronger in male offspring, particularly in the P male. Additionally, P offspring of both sexes showed decreased highly palatable food preference in the feeding test. Regarding the gene expression, R1 and P offspring of both sexes displayed alterations in the RNAm expression of several components of the ECS in the hypothalamus, liver and perirenal adipose tissue (PAT), that were associated to alterations in the gene expression of lipid metabolism-related genes in liver and/or PAT. Especially, R male P female offspring exhibited increased *Cnr1* and *Cnr2* expression in the hypothalamus. Both R and P offspring showed regulated gene expression of the ECS metabolizing enzymes (*Faab*, *Dagl*, *Mgl1*) in the liver and PAT in a sex specific-manner. In general, the alterations in the ECS gene



expression were more apparent in R offspring, and they were accompanied by alterations in the RNA<sup>m</sup> expression of lipid and cholesterol metabolism-related genes in liver (*Cpt1a*, *Fasn*, *Acaca*, *Acox*, *Insig1*, *Hmgcr*, *Ppara*, *Pparγ*) and/or PAT (*Cpt1b*, *Acox1*, *Pparγ*). Taken together, the data show that both restricted and hypercaloric maternal diet can modify perinatal outcomes and metabolic and behavior parameter on the offspring in a sex specific manner. These changes may be associated to modifications in the ECS at birth and/or adulthood. Therefore, these data enhance the importance of the ECS in the programming process, and suggest that research in this area, together with the implementation of preventive programs in critical periods of development, including the pregestational period, and the early detection of offspring with increased vulnerability to develop metabolic and behavioral disorders, might be appropriate strategies to deal with an inadequate programming



# INTRODUCCIÓN

En los siguientes apartados se mostrará la importancia de la nutrición materna en el desarrollo humano, definiéndose el concepto de programación en relación a la misma. Se presentarán evidencias que vinculan la nutrición y, específicamente, la dieta materna con el desarrollo de patologías metabólicas y alteraciones conductuales en etapas posteriores de la vida. Además, se señalarán los principales mecanismos biológicos estudiados en relación a la programación metabólica y conductual. Por último, se realizará una introducción al sistema endocannabinoide, mostrándose su importante papel en la regulación metabólica, y se analizará la posible influencia del mismo en la programación.



# 1. EL ESTADO NUTRICIONAL MATERNO Y LA PROGRAMACIÓN NUTRICIONAL

## 1.1 Necesidades nutricionales durante el desarrollo humano

El desarrollo humano es un proceso altamente complejo, que comienza en la gestación y finaliza un tiempo después del nacimiento. Durante el mismo, un ovocito fecundado terminará convirtiéndose en un ser multicelular, a través de diferentes procesos, que comprenden divisiones celulares, muerte celular programada, migración celular, diferenciación, crecimiento y reordenación de células (Moore & Persaud, 2008).

Se suele dividir el desarrollo humano en dos periodos diferentes: el periodo prenatal, que incluye toda la gestación, y el periodo postnatal, que se produce desde el nacimiento del feto hasta el principio de la edad adulta. El periodo prenatal se divide a su vez en: periodo pre-embrionario, periodo embrionario y periodo fetal. El periodo pre-embrionario se inicia en la fecundación y termina en la semana tercera de la gestación. El periodo embrionario abarca desde la tercera a la octava semana de la gestación y es el estadio en el cual se produce la organogénesis. Por último, el periodo fetal, que se extiende desde la semana novena al fin de la gestación, está caracterizado por el crecimiento, diferenciación y maduración de los tejidos y órganos previamente formados. En lo que respecta al periodo postnatal, durante el mismo se continúa con la maduración de los órganos y se produce un importante crecimiento (Moore & Persaud, 2008; Sadler, 2006). Por tanto, el desarrollo humano es un proceso que se inicia prenatalmente pero continúa un tiempo después, tras el nacimiento del feto, prolongándose hasta etapas avanzadas.

El periodo prenatal, pese a que el desarrollo humano se prolonga durante años, representa un momento de especial vulnerabilidad ante los estímulos adversos ambientales, los cuales pueden interferir en el normal desarrollo. Dentro de los estímulos más influyentes en la salud materna y fetal, se ha destacado el papel de la nutrición materna (World Health Organization, 2013; Barker, 2007; Lucas, 1991). Este aspecto resulta de especial interés pues, específicamente, una dieta materna inadecuada es un factor de riesgo potencialmente

modificable.

Con respecto a las necesidades nutricionales, de forma general, puede considerarse que a lo largo de la gestación, en la futura madre, se van a incrementar las necesidades de los nutrientes generales y específicos con respecto al estado no gestante (**tabla 1**). En ese sentido, además de la ingesta de una dieta equilibrada, se recomienda una suplementación extra de hierro y folatos para prevenir la anemia materna y los defectos del tubo neural (World Health Organization, 2013; Pitkin, 2007; Villar et al., 2003) . En áreas geográficas con especial deficiencia, también se propone la suplementación con vitamina A, calcio o yodo (World Health Organization, 2013).

**Tabla 1. Ingesta dietética de referencia de macronutrientes y algunas vitaminas y elementos para mujeres adultas entre 19-49 años**

Nutriente	Mujer adulta no gestante	Mujer adulta gestante
Proteínas (g/Kg/d)	0.8*,**	1.1 *,**
Carbohidratos (g/d)	130*,**	175*,**
Fibra total (g/d)	25*,**	28*,**
Ácido $\alpha$ -linolénico (g/d)	1.1*,**	1.4*,**
Ácido linoleico (g/d)	12*,**	13*,**
Vitamina A ( $\mu$ g)	600**	700**
Ácido fólico ( $\mu$ g)	300**	500**
Vitamina B6 (mg)	1.2**	1.5**
Vitamina B12 ( $\mu$ g)	2**	2.2**
Vitamina C (mg)	60**	80**
Vitamina D ( $\mu$ g)	5**	10**
Ca (mg)	900**	1000**
Fe (mg)	18**	25**
I ( $\mu$ g)	150**	175**
Zn (mg)	7**	10**

Valores obtenidos del Institute of Medicine (2005)\* y de Cuervo y Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD) de España (2010)\*\*.

Las necesidades nutricionales no son uniformes a lo largo de la gestación, sino que varían a lo largo de la misma. De esta manera, durante el primer trimestre, pese a que el embrión y el feto se desarrollan con extraordinaria rapidez, la necesidad de nutrientes maternos no aumenta de forma significativa con respecto al estado no gestante. En este estadio se presenta un tipo de nutrición específica denominada histiotrófica, presente desde que se produce la implantación y hasta que la placenta empieza a ser funcional. A través de la misma, el blastocisto primero, y después el trofoblasto o el endodermo del saco vitelino, fagocitan nutrientes extracelulares derivados del endometrio o de las glándulas uterinas

(Burton, Watson, Hempstock, Skepper, & Jauniaux, 2002).

Posteriormente, se produce un tipo de nutrición denominada hemotrófica o placentaria, en la cual ya existe un intercambio materno-fetal a través de la placenta (Burton et al., 2002). A partir de ese momento, y ya en el segundo trimestre de la gestación, las necesidades nutricionales maternas empiezan a incrementarse notablemente (Lamni-Keefe, Couch, & Philipson, 2008). Ello responde el aumento del metabolismo basal y el incremento en el crecimiento de útero, mamas, placenta, feto y volumen sanguíneo, impactando claramente en las necesidades energéticas. Así, a partir del cuarto mes de gestación, se va a requerir un aporte extra de energía, que irá aumentando acorde avanza la gestación (Lamni-Keefe et al., 2008; Institute of Medicine, 2005; Institute of Medicine, 1990) (**tabla 2**).

**Tabla 2. Estimación de necesidades energéticas según el momento de la gestación**

	Primer trimestre	Segundo trimestre	Tercer trimestre
<b>Aporte energético recomendado diario</b>	Energía estimada según grupo de edad+ 0 kcal	Energía estimada según grupo de edad+340 kcal	Energía estimada según grupo de edad+ 452 Kcal

Datos obtenidos del Institute of Medicine (2005) y de la FESNAD de España (2010)

La ingesta energética durante la gestación varía en función de numerosos factores. Entre ellos destaca el peso pre-gestacional, la cantidad de peso ganado durante el embarazo, la actividad física y el momento de la gestación, por lo que resulta complicado hacer una evaluación de la misma (Lamni-Keefe et al., 2008). Considerando estas cuestiones y a efectos prácticos, el estado nutricional materno suele evaluarse a través de medidas antropométricas, concretamente a través del peso ganado en la gestación (Institute of Medicine, 1990). Esta variable, que guarda una estrecha relación con la ingesta energética y resulta de más fácil y rápida obtención, es monitorizada de forma rutinaria por los profesionales de la salud implicados en este periodo de la vida en la mayoría de los países occidentales (Scott et al., 2014).

Resulta importante considerar que las necesidades energéticas requeridas son pequeñas en relación a la necesidad de nutrientes concretos, por lo que se hace necesario enfatizar en la ingesta de alimentos específicos para evitar déficits nutricionales (Lamni-Keefe et al., 2008).

También es preciso señalar que el incremento en las necesidades energéticas puede hacerse a expensas de diferentes alimentos y no todos poseen el mismo valor biológico. En ese sentido, los suplementos energéticos a base de proteínas se han mostrado especialmente importantes para prevenir problemas perinatales adversos (Gresham, Byles, Bisquera, & Hure, 2014). Todas estas consideraciones resaltan la importancia de la monitorización dietética durante la gestación, además de la evaluación de la ganancia ponderal. Sin embargo, este aspecto, no siempre se aborda de forma sistemática en las consultas prenatales (Lucas, Charlton, & Yeatman, 2014).

## 1.2 La ganancia ponderal durante la gestación

Se considera que una adecuada ganancia de peso materno es necesaria para alcanzar un óptimo crecimiento fetal y para la prevención de problemas de salud futuros tanto en los niños como en las madres (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013; Thorsdottir, Torfadottir, Birgisdottir, & Geirsson, 2002). Pero no es solo la ganancia durante la gestación el único parámetro a tener en cuenta. El índice de masa corporal pre-concepcional es un predictor potente e independiente de los resultados gestacionales (Li et al., 2013; Institute of Medicine, 2009; Nohr et al., 2008).

De acuerdo al IOM (Instituto de Medicina Americano), se aconseja que las mujeres comiencen la gestación con un índice de masa corporal en valores normales, concretamente entre 18.5-24.9 Kg/g, y que la ganancia total de peso durante todo el embarazo tenga en consideración ese índice de masa corporal pre-gestacional. Así, la ganancia de peso recomendada durante la gestación varía en función de la delgadez-obesidad de la mujer al inicio de la gestación, recomendándose mayores ganancias de peso en mujeres extremadamente delgadas y ganancias ponderales muy moderadas en mujeres obesas (Institute of Medicine, 2009) (**tabla 3**).

Tanto la excesiva ganancia de peso durante la gestación como la deficiente ganancia de peso están asociadas a complicaciones maternas y fetales. En los países occidentales, la mayoría de las mujeres ganan más peso del recomendable (Gould Rothberg, Magriples, Kershaw, Rising, & Ickovics, 2011; Crane, White, Murphy, Burrage, & Hutchens, 2009). Ello ha hecho que numerosos estudios hayan profundizado en los efectos de la excesiva ganancia de peso durante la gestación (Lee et al., 2014; Fraser et al., 2011). De esta manera,



se ha documentado que la excesiva ganancia de peso incrementa el riesgo de padecer trastornos hipertensivos (Li et al., 2013; Crane et al., 2009), cesárea (Li et al., 2013; Stotland, Hopkins, & Caughey, 2004) o del nacimiento de niños con macrosomía o recién nacidos grandes para la edad gestacional (Lee et al., 2014; Li et al., 2013; Crane et al., 2009; Simas et al., 2012; Nohr et al., 2008).

Con respecto a las mujeres ya obesas o con sobrepeso en el momento de iniciar la gestación, además de recomendarse una ganancia moderada de peso gestacional (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013), se aconseja perder peso antes de la gestación, con el objetivo de reducir el riesgo de desarrollar patologías obstétricas como la diabetes gestacional o pre-eclampsia (Mostello et al., 2010; Institute of Medicine, 2009; Glazer, Hendrickson, Schellenbaum, & Mueller, 2004; Pole & Dodds, 1999). Sin embargo, poco se sabe sobre las consecuencias a largo plazo que puede tener perder peso cerca del periodo periconcepcional, el cual es considerado como un periodo crítico del desarrollo (Matusiak, Barrett, Callaway, & Nitert, 2014). Por otra parte, la ganancia de peso por debajo de las recomendaciones del IOM en este tipo de mujeres, ha mostrado ser eficaz para disminuir el riesgo de pre-eclampsia, cesárea y macrosomía, aunque también se ha relacionado con un incremento el riesgo de parto pretérmino y de recién nacidos con bajo peso para la edad gestacional (Kapadia et al., 2015).

Aunque la preocupación por la excesiva ganancia ponderal gestacional es habitual en los profesionales sanitarios implicados en la gestación, el problema de la nutrición deficiente y, por tanto, de la deficiente ganancia de peso, continúa siendo un problema a nivel mundial no exclusivo de países menos desarrollados. Así, en las sociedades occidentales existe una excesiva presión hacia la delgadez y muchas mujeres experimentan preocupación en lo que respecta a ganar peso excesivo y al cambio de sus cuerpos durante la gestación y el postparto (Easter et al., 2013). Estas preocupaciones son especialmente importantes en mujeres con antecedentes de trastornos de la conducta alimentaria, tales como la anorexia y bulimia (Micali, Simonoff, & Treasure, 2007). Concretamente, este grupo de mujeres presentan un riesgo elevado de no alcanzar las recomendaciones en relación al peso propuestas por la IOM, y por tanto de tener complicaciones perinatales tales como parto pre-término, recién nacidos con bajo peso para la edad gestacional, baja puntuación en el test de Apgar al nacimiento o aumento en el riesgo de cesárea (Linna et al., 2014; Pasternak et al., 2012; Treasure & Russell, 1988).

Tabla 3. Ganancia de peso recomendada durante la gestación según el IMC pregestacional

IMC pregestacional	Gestación: Ganancia de peso total	Segundo/Tercer trimestre: Ganancia de peso media semanal
Peso bajo (<18.5 kg/m <sup>2</sup> )	12.5-18 Kg	0.51 (0.44-0.58) Kg/semana
Normopeso (18.5-24.9 Kg/m <sup>2</sup> )	11.5-16 Kg	0.42 (0.35-0.50) Kg/semana
Sobrepeso (25-29.9 Kg/m <sup>2</sup> )	7-11.5 Kg	0.28 (0.23-0.33) Kg/semana
Obesidad (>30 Kg/m <sup>2</sup> )	5-9 Kg	0.22 (0.17-0.27) Kg/semana

Se asume que durante el primer trimestre el peso medio ganado puede oscilar entre 0.5-2 Kg. Adaptado de IOM (2009)

En relación a las mujeres con normopeso en el momento de iniciar la gestación, se ha documentado que cuando la ganancia de peso no alcanza los límites propuestos por la IOM, disminuye el riesgo de pre-eclampsia, desproporción pélvico cefálica, fallo de inducción del parto, cesárea y de recién nacidos grandes para la edad gestacional, pero también aumenta el riesgo de recién nacidos con bajo peso para la edad gestacional (DeVader, Neeley, Myles, & Leet, 2007). Además, se ha señalado en este grupo de mujeres, que la pérdida de peso antes de la gestación incrementa en los recién nacidos el riesgo de presentar bajo peso al nacimiento (Diouf et al., 2011).

Todos estos aspectos ponen en relieve la necesidad de realizar un seguimiento de la ganancia de peso de forma precoz, lo cual sería deseable desde la fase pre-concepcional. Además, sugieren la importancia de identificar a las mujeres de riesgo, con síntomas de trastornos alimentarios o con condiciones nutricionales inadecuadas por defecto o por exceso, antes o durante la gestación con el objetivo de evitar complicaciones posteriores.

Aparte de los resultados obstétricos inmediatos, derivados de una inadecuada ganancia de peso durante la gestación anteriormente descritos, existe una creciente preocupación por el efecto que unas condiciones nutricionales adversas, en momentos críticos del desarrollo, pudieran tener en la salud futura del individuo. Todo ello se enmarca en el concepto de

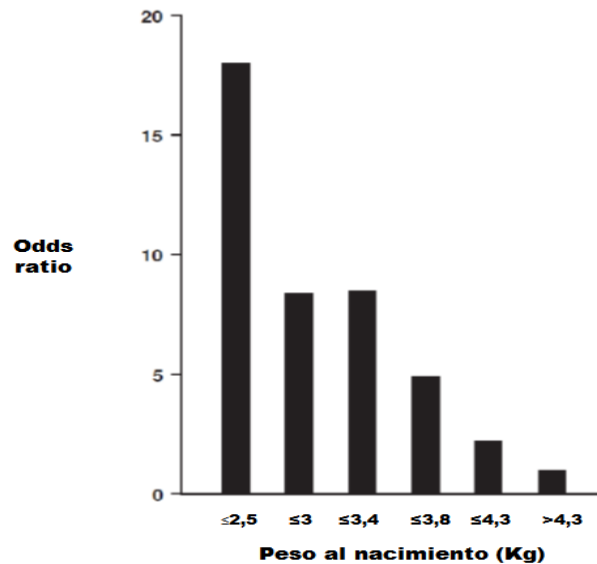
programación nutricional.

### 1.3 Concepto de programación nutricional

La idea de que la exposición a ciertos estímulos durante periodos críticos del desarrollo puede incrementar el riesgo de desarrollar enfermedades en etapas posteriores de la vida ha sido apoyada por numerosos estudios epidemiológicos y animales. Este proceso se conoce como programación o *programming* (Lucas, 1991), y forma parte de la hipótesis de “El origen de la salud y la enfermedad en los procesos del desarrollo”, más conocida por su terminología en la lengua inglesa como “*Developmental Origins of Health and Disease Hypothesis*” (DOHaD) (Gluckman & Hanson, 2004; Hales & Barker, 2001; Barker, 1995; Barker et al., 1993; Barker, Winter, Osmond, Margetts, & Simmonds, 1989).

El origen y la autoría de esta teoría han sido debatidos por diferentes autores. De esta manera, Kuzawa (2005) propuso que Kermack y colaboradores fueron los primeros en documentar que la esperanza de vida estaba determinada por las condiciones ambientales de las etapas tempranas del desarrollo (Kuzawa, 2005; Kermack, McKendrick, & Mckinlay, 1934). También Günter Dörner, fue considerado por Koletzko (2005) y Plageman (2004) como uno de los primeros en utilizar el término de programación, y en señalar que la exposición a ciertos estímulos hormonales o metabólicos durante el desarrollo del hipotálamo podía conducir a trastornos hormonales o del metabolismo en etapas posteriores de la vida (Dörner, 1975; Koletzko, 2005; Plagemann, 2004). De forma independiente y en esa misma década, Forsdahl mostró que las condiciones nutricionales deficientes en etapas tempranas de la vida se asociaban a un aumento en el riesgo de enfermedades coronarias, en la etapa adulta, si especialmente en esa etapa había abundancia de nutrientes (Forsdahl, 1977). Paralelamente o posteriormente, otros autores llegaron a conclusiones similares mostrando en sus investigaciones relaciones entre el ambiente perinatal y el posterior riesgo de enfermedades cardiovasculares (Ounsted, Cockburn, Moar, & Redman, 1985; Ravelli, Stein, & Susser, 1976; Knittle, 1972) . No obstante, parece que David Barker y su equipo, a finales de los 80, a través de sus estudios epidemiológicos, lograron desarrollar la hipótesis DOHaD, haciéndola ampliamente conocida. Teniendo en cuenta sus resultados, que mostraban una alta correlación entre el bajo peso al nacimiento y el desarrollo posterior de enfermedades metabólicas (*figura 1*), estos autores formularon la hipótesis del fenotipo ahorrador, también denominada hipótesis de Barker. En la misma ya

integraban el concepto de programación acuñado por Lucas (1991) (Hales & Barker, 2001; Barker, 1995; Hales & Barker, 1992).



*Figura 1.* Odds ratio para el desarrollo de síndrome metabólico según el peso al nacimiento. Valores estimados en hombres nacidos en Hertfordsire (n=407). Ajuste según IMC en edad adulta. Adaptado de Hales y Barker (2001).

La hipótesis del fenotipo ahorrador se propuso en contraposición a la teoría del genotipo ahorrador, que había sido formulada por Neel previamente (Neel, 1962). La teoría del genotipo ahorrador postulaba que los genes diabetogénicos o ahorradores persistían en alto nivel en la población, pues ello había conferido una ventaja adaptativa en etapas de privación nutricional. De ahí, que la selección natural hubiera favorecido a estos individuos en épocas pasadas, en las que el acceso a los alimentos no era continuo. Sin embargo, en etapas de sobrenutrición y caracterizadas por el sedentarismo, esos genes ahorradores aumentaban la predisposición a desarrollar obesidad y resistencia a la insulina y, por consiguiente, la prevalencia de diabetes (Neel, 1999; Neel, 1962). En cambio, la teoría del fenotipo ahorrador trataba de explicar la etiología de la diabetes tipo 2 y del síndrome metabólico, haciendo énfasis en los factores ambientales (Hales & Barker, 2001). De acuerdo a la misma, se consideraba que una nutrición deficiente (especialmente a expensas de una disminución en las proteínas y aminoácidos) en la etapa fetal y postnatal temprana, imponía unas condiciones de ahorro nutricional, y ello tenía consecuencias negativas en el desarrollo del individuo, provocando cambios permanentes en ciertos órganos y tejidos.

Específicamente, de acuerdo a la teoría del fenotipo ahorrador, se consideraba que la malnutrición provocaba un déficit de las células  $\beta$  pancreáticas y la afectación en el crecimiento de los islotes de Langerhans. Ello confería inicialmente una ventaja adaptativa a los niños malnutridos, dado que ante la deficiencia de nutrientes no era necesaria una gran liberación de grandes cantidades de insulina. Sin embargo, posteriormente, ante la exposición a un ambiente obesogénico, rico en nutrientes y con falta de actividad física, los individuos con afectación ya permanente del páncreas, presentaban mayor vulnerabilidad para desarrollar diabetes tipo 2. Además, esas condiciones de malnutrición fetal iban a incrementar el riesgo de desarrollar hipertensión, resistencia a la insulina y obesidad, contribuyendo así a la aparición del síndrome metabólico en la edad adulta (Hales & Barker, 2001; Hales & Barker, 1992;) (*figura 2*). Años después, con la hipótesis de la respuesta adaptiva predictiva de Gluckman et al. (2004), se empezó a enfatizar en el papel del ambiente postnatal, considerándose que el riesgo de desarrollar síndrome metabólico era mayor cuando había una discordancia entre el ambiente prenatal, al que el feto se había adaptado intrauterinamente, y el ambiente postnatal (Gluckman & Hanson, 2004). Estos aspectos contribuyeron a modificar ligeramente la teoría del fenotipo ahorrador, que fue posteriormente reformulada (Hales & Barker, 2001).

En lo que respecta a los estímulos que influyen en la programación, aunque se han identificado varios (exposición a ciertas hormonas, estrés, tabaco), se le ha concedido especial atención a los estímulos nutricionales, de los cuales se deriva el concepto de programación nutricional. Otros términos, comúnmente encontrados en la literatura para describir este fenómeno son el de impronta (*imprinting*), programación metabólica, programación fetal, perinatal o del desarrollo (Remmers & Delemarre-van de Waal, 2011; Plagemann, 2004).

En relación al momento en que se produce la programación, es preciso considerar el concepto de periodo o ventanas críticas del desarrollo. Un periodo crítico puede definirse como el momento en el tiempo en el que una experiencia afecta al organismo mucho más que en otro periodo de la vida, de ahí que se pueda producir un fallo en el progreso del desarrollo de un estadio al siguiente y ello pueda provocar un déficit permanente (Roseboom, 2000; Susser & Levin, 1999). Entre todos los periodos críticos, el prenatal ha sido el más estudiado, considerándose además crucial por producirse en él la formación y maduración de la mayoría de los órganos. Del estudio del impacto de la exposición a ciertos estímulos en este periodo crítico, deriva el concepto de programación fetal (Barker,

2007). Sin embargo, el periodo en el cual se produce la programación podría ser más extenso (Lucas, 2005), habiendo probablemente más ventanas críticas que incluyan periodos de gran crecimiento, como son la lactancia e incluso la infancia y la pubertad, en los cuales el individuo puede resultar especialmente vulnerable (Frazier, Mason, Zhuang, & Beeler, 2008; Neu, Hauser, & Douglas-Escobar, 2007).

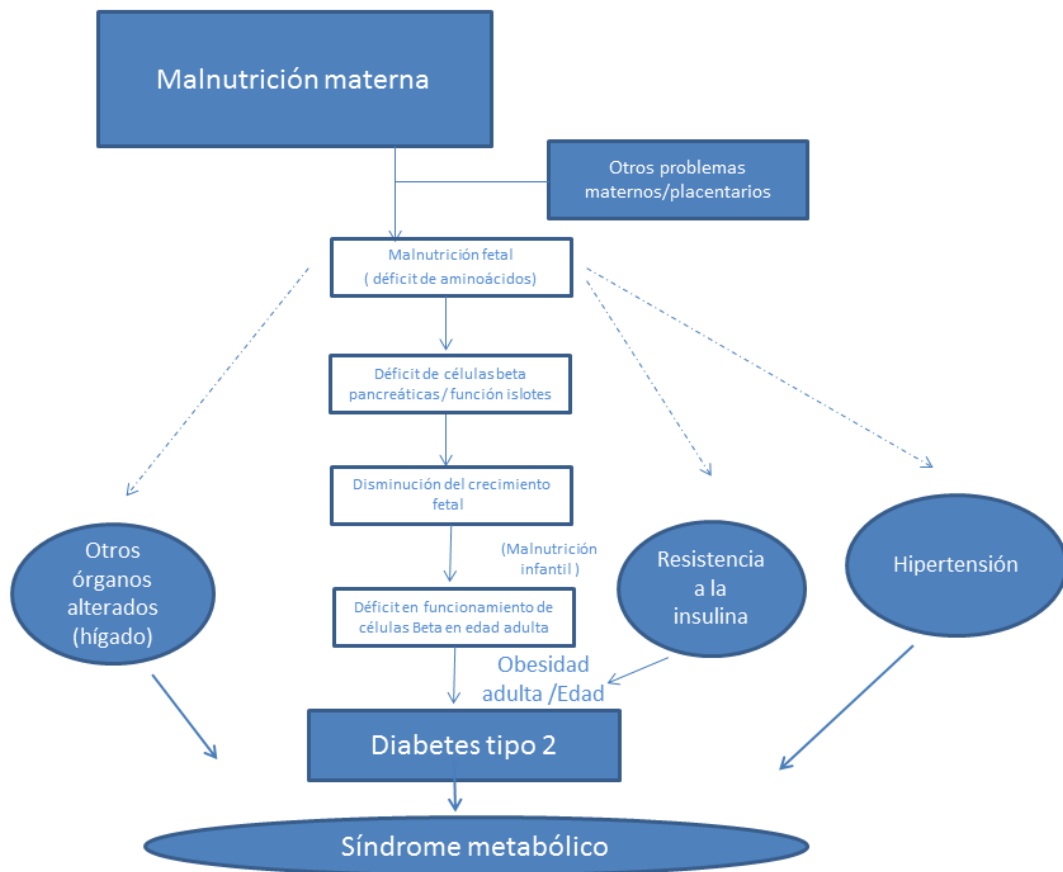


Figura 2. Hipótesis del fenotipo ahorrador. Adaptado de Hales y Barker (1992).

Con respecto al periodo postnatal, diferentes estudios han mostrado que ciertas condiciones nutricionales y/o el tipo de crecimiento durante los primeros años de vida pueden incrementar la vulnerabilidad a desarrollar obesidad infantil. Específicamente, y de acuerdo a la teoría del fenotipo ahorrador, que fue reevaluada por Hales & Barker (2001), y consideraba los resultados obtenidos de la cohorte holandesa, se ha señalado como un factor importante en el desarrollo del síndrome metabólico la acelerada ganancia de peso postnatal producida en los individuos que nacen con bajo peso al nacimiento. Estos aspectos fueron especialmente evidentes en los sujetos que nacieron durante la hambruna

de Leningrado. En esta cohorte no se había presentado este crecimiento compensador rápido, encontrándose un riesgo similar a desarrollar síndrome metabólico en los expuestos y no expuestos al déficit nutricional durante la gestación (Stanner et al., 1997). Algunos autores han intentado clarificar la cuestión de cuáles son los años cruciales en los que debería producirse esa elevada ganancia de peso o crecimiento compensador para que se incremente el riesgo de desarrollar síndrome metabólico posteriormente. En los estudios realizados, el tiempo varía desde los primeros meses de vida (Singhal, Fewtrell, Cole, & Lucas, 2003; Stettler, Zemel, Kumanyika, & Stallings, 2002), a los primeros dos años (Toschke, Grote, Koletzko, & von Kries, 2004; Ong & Dunger, 2002;). Incluso se ha considerado que la elevada ganancia de peso en el periodo postnatal por sí misma, independientemente del ambiente prenatal, es un factor riesgo de posterior obesidad (Cole, 2004; Stettler et al., 2002), lo que pone en evidencia que la programación metabólica puede producirse más allá de la etapa prenatal. Por ejemplo, la elevada ganancia de peso durante los primeros años de vida, asociada a su vez a la introducción temprana de alimentos sólidos, puede incrementar el riesgo para padecer obesidad (Sloan, Gildea, Stewart, Sneddon, & Iwaniec, 2008) Por otra parte, la lactancia materna parece disminuir el riesgo de obesidad, siendo este efecto protector más intenso cuando se prolonga el tiempo de lactancia (Owen et al., 2005; Arenz, Ruckerl, Koletzko, & von Kries, 2004; von Kries et al., 1999). También, el tipo de nutrientes ingeridos en la etapa postnatal, ha resultado ser importante. De esta manera, ciertas fórmulas enriquecidas, administradas a niños nacidos prematuramente, han mostrado aumentar el riesgo de alteración en el metabolismo de los hidratos de carbonos en etapas posteriores de la vida (Singhal et al., 2003). De forma similar, se ha sugerido que la alta densidad en hidratos de carbono presente en las comidas para bebés podría incrementar la vulnerabilidad a padecer sobrepeso posteriormente, tal y como se ha constatado con modelos animales (Patel & Srinivasan, 2011; Srinivasan et al., 2008). Adicionalmente, la elevada ingesta de proteínas a los dos años de edad, se ha asociado a un mayor aumento de grasa corporal en la infancia tardía, lo cual a su vez podría aumentar el riesgo de obesidad en la etapa adulta (Rolland-Cachera, Deheeger, Akrouit, & Bellisle, 1995). Todos estos aspectos señalan la importancia de este periodo infantil en la programación.

Los modelos animales de exposición a dieta materna hipercalórica también han resaltado el papel del ambiente postnatal, el cual podría contribuir en la potenciación de los síntomas provocados por una mala programación o “*malprogramming*” en etapas tempranas. De esta

manera, el ambiente obesogénico similar al producido intraútero podría exacerbar ciertas características del síndrome metabólico (Dahlhoff et al., 2014; Chen, Simar, & Morris, 2009; Howie, Sloboda, Kamal, & Vickers, 2009; White, Purpera, & Morrison, 2009; Bayol, Simbi, Bertrand, & Stickland, 2008; Samuelsson et al., 2008; Shankar et al., 2008). Sin embargo, la exposición a un ambiente normocalórico, no siempre logra prevenir los efectos de la programación, mostrándose así la importancia del ambiente perinatal en la capacidad de alterar parámetros metabólicos en etapas posteriores de la vida independientemente de la dieta postnatal (Chen et al., 2009; Howie, Sloboda, Kamal, & Vickers, 2009; White et al., 2009).

Por otra parte, los periodos pre-concepcional y pre-implantacional se han apuntado como elementos críticos en el desarrollo posterior de enfermedades. Esto ha sido evidenciado tras manipulaciones nutricionales en estos periodos (Kwong, Wild, Roberts, Willis, & Fleming, 2000) y también a través de la investigación en las técnicas de reproducción asistida, las cuales han mostrado que las características nutricionales del medio donde el embrión es cultivado pueden aumentar el riesgo de desarrollar síndrome metabólico en etapas posteriores de la vida (Serrano et al., 2014; Watkins et al., 2007).

## **1.4 Enfermedades que se originan en estadios iniciales del desarrollo**

En relación a las enfermedades que pueden verse programadas, se han identificado diversas patologías que podrían tener un origen en la vida temprana, como son las enfermedades de las vías respiratorias, cáncer o incluso algunos trastornos psiquiátricos (Painter et al., 2006; Lopuhaa et al., 2000; Neugebauer, Hoek, & Susser, 1999; Hoek et al., 1996). Sin embargo, la mayor parte de la investigación se ha centrado en las enfermedades cardiovasculares (Barker, 2006; Eriksson et al., 2002; Eriksson, Forsen, Tuomilehto, Osmond, & Barker, 2001; Roseboom, van der Meulen, Osmond, Barker, Ravelli, & Bleker, 2000; Roseboom, van der Meulen, Osmond, Barker, Ravelli, Schroeder-Tanka et al., 2000; Ravelli, van Der Meulen, Osmond, Barker, & Bleker, 1999; Barker et al., 1993; Barker, 1991; Ravelli et al., 1976), las cuales continúan siendo la primera causa de años de vida perdidos en todo el mundo. Muy relacionadas con ellas se encuentran la obesidad y el síndrome metabólico.

Con respecto a la obesidad, su prevalencia se ha doblado desde el año 1980.



Específicamente, en 2014, el 11% en hombres y el 15% en las mujeres mayores de 18 años padecían obesidad (World Health Organization, 2014). España no resulta ajena a esta epidemia mundial, siendo la prevalencia de sobrepeso en el año 2011 del 36.6%, mientras que la de obesidad era del 17.3% para los dos sexos (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2015).

La obesidad afecta principalmente a países con alto desarrollo socio-económico, aunque no es exclusivo de los mismos, encontrándose cada vez más extendida en países en desarrollo intermedio. De hecho, en estos países se ha constatado la presencia de un fenómeno paradójico en aumento en el que coexiste la obesidad adulta junto con desnutrición infantil dentro del mismo núcleo familiar denominado “doble carga de malnutrición” o “*double burden of malnutrition*” (Jehn & Brewis, 2009; Doak, Adair, Bentley, Monteiro, & Popkin, 2005). Considerando que la desnutrición infantil puede aumentar el riesgo de desarrollar patologías metabólicas en la etapa adulta, en presencia de un ambiente más rico en nutrientes en etapas posteriores de la vida (Langley-Evans, 2015; Gluckman & Hanson, 2004; Hales & Barker, 2001), este fenómeno en parte podría ser explicado por la hipótesis de la programación.

La obesidad incrementa el riesgo de enfermedad cardiovascular, diabetes tipo 2 y cáncer (World Health Organization, 2004), y aunque está considerado como un trastorno médico, se ha sugerido también, considerando los factores que influyen en su desarrollo, conceptualizarla como un trastorno de la conducta, en especial porque la obesidad presenta una importante comorbilidad psiquiátrica (Vanbuskirk & Potenza, 2010; Stunkard, Faith, & Allison, 2003).

Especialmente preocupante resulta la obesidad infantil, pues la misma se asocia a un mayor riesgo de muerte prematura y mayor riesgo de morbilidad cardiovascular en la etapa adulta (diabetes, hipertensión, isquemia coronaria, accidente cerebrovascular) (Reilly & Kelly, 2011), además de a una disminución en la calidad de vida y mayor riesgo de sufrir acoso escolar, aislamiento social, baja autoestima y otros problemas psicológicos (Stensland, Thoresen, Wentzel-Larsen, & Dyb, 2015; Huang, Lanza, Wright-Volel, & Anglin, 2013; Williams, Wake, Hesketh, Maher, & Waters, 2005). En 2012 se estimó que 44 millones de niños en todo el mundo, lo que supone un 6.7%, presentaban obesidad o sobrepeso (World Health Organization, 2014). Específicamente en España, los datos ofrecidos por el estudio ALADINO en 2013, que tuvieron en consideración los estándares de crecimiento

de la OMS, estimaron la prevalencia de exceso de peso de niños en el 43%, siendo la prevalencia de sobrepeso del 24.6% y la de obesidad del 18.4% (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad., 2014). Todo ello pone en evidencia que en nuestra sociedad es un problema importante y presente desde etapas muy tempranas.

Íntimamente relacionado con la obesidad se encuentra el síndrome metabólico. El mismo puede definirse como un compendio de factores interconectados de tipo metabólico, fisiológico, bioquímico y clínico, que van a incrementar el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular aterosclerótica (Kaur, 2014; Grundy et al., 2005). Los pacientes diagnosticados de este síndrome, presentan un riesgo cinco veces mayor de desarrollar diabetes tipo 2 (Alberti et al., 2009), lo que ha hecho que algunos autores hayan considerado proponerlo como un estado pre-diabético (Grundy, 2012).

Se considera al síndrome metabólico como un estado de inflamación crónica en el que entran en juego diferentes factores tales como la resistencia a la insulina, la adiposidad visceral, la dislipemia, la disfunción endotelial, la hipercoagulabilidad, la elevación de las cifras tensionales, el estrés y los factores genéticos (Kaur, 2014). Para su diagnóstico se requiere la presencia de 3 de los 5 factores de riesgo principales que serían: la obesidad abdominal, elevación de la glucosa, elevación de la presión arterial, hipertrigliceridemia y disminución en las lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) (Alberti et al., 2009)(**tabla 4**).

Dentro de la etiología de los problemas cardiovasculares, y también de la obesidad y síndrome metabólico, se han contemplado los hábitos inadecuados de vida junto con la contribución de la herencia genética (Kaur, 2014). En lo que respecta a los hábitos inadecuados de vida, se han destacado especialmente el sedentarismo, el tabaquismo, la ingesta de dietas hipercalóricas y el estrés. En los niños, también se han señalado como especialmente importantes en la etiología de la obesidad infantil y riesgo subsecuente de síndrome metabólico, el aumento del consumo de comida rápida o “comida basura” (caracterizada por ser más rica en calorías, grasa, y tener más azúcares añadidos), el fácil acceso a la misma y el importante número de anuncios televisivos emitidos en horario infantil en los que se publicita (Austin et al., 2005; Harrison & Marske, 2005). En cuanto a la herencia genética, se han encontrado algunos polimorfismos que podrían contribuir al desarrollo de estas patologías en presencia de ciertas condiciones ambientales (Vattikuti, Guo, & Chow, 2012; Laakso, 2004). Sin embargo, la implementación de medidas

preventivas incidiendo en los hábitos de vida no siempre ha logrado obtener resultados satisfactorios o los alcanzados han sido de un alcance limitado (Korczak, Dietl, & Steinhäuser, 2011; Ebrahim & Smith, 1997;). La cuestión es que parece que algunos individuos expuestos a las mismas condiciones ambientales podrían presentar mayor vulnerabilidad al desarrollo de ciertas enfermedades, realizándose así el papel de la programación (Barker, 2007).

**Tabla 4. Criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico**

Factor de riesgo	Punto de corte para su diagnóstico
Circunferencia abdominal elevada	De acuerdo a las definiciones específicas según país/población.
Triglicéridos elevados (o en su defecto presencia de tratamiento para la hipertrigliceridemia)	$\geq 150$ mg/dl (1.7mmol/L)
Disminución en HDL-C (o en su defecto presencia de tratamiento farmacológico para paliar el déficit de HDL-C)	<40mg/dl (1.0 mmol/L): hombres <50 mg/dl (1.3 mmol/L): mujeres
Elevación en las cifras tensionales (o en su defecto presencia de tratamiento antihipertensivo en pacientes con historia de HTA)	PA sistólica $\geq 130$ y/o PA diastólica $\geq 85$ mm Hg
Elevación de la glucosa en ayunas (o en su defecto tratamiento para la hiperglucemia)	$\geq 100$ mg/dl

Datos obtenidos de Alberti y cols. (2009)

Considerando que ciertas condiciones ambientales en etapas críticas del desarrollo pueden favorecer o dificultar la expresión de ciertos genes implicados en aspectos metabólicos aumentando así la vulnerabilidad a desarrollar alteraciones metabólicas (Langley-Evans, 2015), algunos autores han señalado la importancia de incluir los estadios iniciales del desarrollo en los programas de prevención de estas enfermedades cardiovasculares (Robinson et al., 2015; Barker, 2007). Coherente con esa idea, en los últimos años, diferentes estudios han señalado los beneficios de intervenciones nutricionales en periodos críticos, tales como la gestación (Gresham et al., 2014; Abu-Saad & Fraser, 2010). Sin embargo, parece necesario profundizar más extensivamente en estos aspectos. Algunas

investigaciones evidencian que las intervenciones nutricionales en el periodo prenatal continúan siendo insuficientes (Lucas et al., 2014). Además, el periodo preconcepcional, continúa estando escasamente considerado, y las actividades realizadas por los profesionales de salud implicados en estos periodos críticos siguen centrándose en los efectos inmediatos, quedando por tanto también pendiente de demostrar el impacto de estas medidas preventivas a largo plazo.

## **1.5 La utilidad de los modelos animales para estudiar el fenómeno de la programación nutricional**

En lo que respecta a la investigación en la programación del desarrollo de enfermedades en etapas adultas, se han empleado principalmente modelos epidemiológicos y modelos animales.

Las cohortes prospectivas humanas poseen un enorme valor, pues permiten determinar asociaciones entre el estado nutricional materno y los resultados en la descendencia. Sin embargo, son estudios complejos, caros y a menudo existen variables incontrolables que influyen en los resultados tipo genético y ambiental (Taylor & Poston, 2007). También son largos y no permiten indagar en la causalidad (Neu, Hauser, & Douglas-Escobar, 2007). Como alternativa a los mismos, los modelos animales han podido apoyar las hipótesis planteadas por los epidemiólogos, venciendo algunas de esas barreras.

Dentro de las ventajas que presentan los modelos animales, es preciso resaltar que en los mismos las condiciones genéticas pueden estar muy controladas. Además, los resultados obtenidos muestran gran paralelismo con las observaciones realizadas en humanos y permiten indagar en los mecanismos implicados en la programación (Rkhezay-Jaf, O'Dowd, & Stocker, 2012), así como investigar en las posibles terapias que pueden ser implementadas de forma temprana, por ejemplo durante la gestación y el periodo neonatal, para revertir una mala programación, evitando los dilemas éticos que presenta la investigación en humanos (Chavatte-Palmer, Tarrade, & Rousseau-Ralliard, 2016).

Sin embargo, los estudios realizados en animales también presentan limitaciones. La especie elegida es una de ellas. La mayoría de las veces se utilizan roedores y ovejas, aunque también se han empleado primates no humanos y otros mamíferos como el cerdo o el conejo. En cuanto a los roedores, su fácil manejo, bajo coste y reproducibilidad los señalan

como buenos candidatos. También sus periodos cortos de gestación y en general de vida representan una ventaja. Estos modelos presentan grandes similitudes con humanos en lo que respecta a la placenta, pero en relación al desarrollo temprano hay importantes diferencias, ya que son especies altriciales, lo que indica que sus órganos maduran después del nacimiento. Eso hace que factores postnatales sean especialmente importantes para ellos. Por ejemplo, en lo que respecta al páncreas de la rata, éste madura postnatalmente, mientras que en los fetos humanos las células beta ya producen insulina antes de nacer. Los primates no humanos en cambio, aunque son los más similares a nuestra especie, alargan la investigación, pues presentan gestaciones más prolongadas y también la encarecen. Además, en relación a las diferentes especies puede haber importantes diferencias en cuanto a la edad materna, paridad, longitud de la gestación número de fetos y variabilidad en el desarrollo fetoplacentario. Todo ello debe ser considerado al extrapolar los resultados a humanos. (Chavatte-Palmer et al., 2016; Brenseke, Prater, Bahamonde, & Gutierrez, 2013; Langley-Evans, 2013).



## 2. EFECTO DE LAS DIETAS MATERNAS RESTRINGIDAS E HIPERCALÓRICAS EN LA PROGRAMACIÓN METABÓLICA Y CONDUCTUAL: MECANISMOS BIOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN EL PROCESO

Este apartado se aborda en el **artículo 1**.

### 2.1 Artículo 1

#### *El papel de la dieta materna en la programación metabólica y conductual: Revisión de los mecanismos biológicos implicados*

En este artículo se revisan los efectos de la subnutrición y sobrenutrición en la descendencia. Específicamente se enumeran algunos efectos metabólicos y conductuales observados en la descendencia tras la exposición a condiciones nutricionales deficientes o excesivas en periodos críticos del desarrollo, y particularmente tras la exposición a dietas maternas restringidas e hipercalóricas. Además, se revisan los mecanismos biológicos implicados en el proceso de programación, resaltándose la utilidad de los modelos animales para identificarlos. Se destaca la importancia de implementar medidas preventivas en estos periodos críticos, para evitar una mala programación, e indagar en los mecanismos involucrados, siendo ésta considerada una estrategia de utilidad en la búsqueda de medidas terapéuticas y preventivas eficaces.



## Revisión

# El papel de la dieta materna en la programación metabólica y conductual: revisión de los mecanismos biológicos implicados

María Teresa Ramírez-López<sup>1,2</sup>, Mariam Vázquez Berrios<sup>1,3</sup>, Rocío Arco González<sup>3</sup>,  
Rosario Noemí Blanco Velilla<sup>1</sup>, Juan Decara del Olmo<sup>3</sup>, Juan Suárez Pérez<sup>3</sup>,  
Fernando Rodríguez de Fonseca<sup>1,3</sup> y Raquel Gómez de Heras<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Psicobiología. Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid, Pozuelo de Alarcón, Madrid.

<sup>2</sup>Hospital Universitario de Getafe. Servicio de Ginecología y Obstetricia, Getafe, Madrid. <sup>3</sup>Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga. Universidad de Málaga, Málaga, España.

## Resumen

En los últimos años, un importante número de investigaciones se han centrado en el estudio de los efectos de la subnutrición y sobrenutrición durante periodos críticos del desarrollo así como en el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas en etapas posteriores. Adicionalmente, las dietas maternas inadecuadas han sido implicadas en la programación errónea de las funciones cerebrales y ciertos comportamientos. Se han asociado con el proceso de una mala programación diferentes mecanismos tales como modificaciones epigenéticas, excesivo estrés oxidativo o alteraciones hipotalámicas. Estas evidencias apoyan la idea de que la prevención nutricional debe ser considerada desde estadios tempranos del desarrollo que incluyan el periodo preconcepcional. Además, la investigación sobre los mecanismos implicados puede resultar particularmente útil en la búsqueda de terapias eficientes para hacer frente a una mala programación.

(*Nutr Hosp.* 2015;32:2433-2445)

DOI:10.3305/nh.2015.32.6.9716

Palabras clave: *Desarrollo fetal. Desnutrición. Hipernutrición. Dieta. Conducta. Enfermedades metabólicas.*

## THE ROLE OF MATERNAL DIET IN METABOLIC AND BEHAVIOURAL PROGRAMMING: REVIEW OF BIOLOGIC MECHANISMS INVOLVED

### Abstract

Over the last few years, a considerable amount of studies have focused on the effect of undernutrition and overnutrition during critical periods of offspring development and their risk of developing metabolic diseases later in life. Additionally, inadequate maternal diets have been involved in the malprogramming of brain functions and some behaviours. Several mechanisms have been associated with the process of malprogramming such as epigenetics modifications, excessive oxidative stress or hypothalamic alterations. This evidence supports the idea that nutritional prevention strategies must be considered for offspring during early development stages that include the preconceptional period. Additionally, studying involved mechanisms could be particularly useful in the search of efficient therapies against malprogramming.

(*Nutr Hosp.* 2015;32:2433-2445)

DOI:10.3305/nh.2015.32.6.9716

Key words: *Fetal development. Malnutrition. Overnutrition. Diet. Behavior. Metabolic diseases.*

**Correspondencia:** María Teresa Ramírez López, Raquel Gómez de Heras y Fernando Rodríguez de Fonseca. Departamento de Psicobiología. Facultad de Psicología. Universidad Complutense de Madrid. Avda Campus de Somosaguas s/n, 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain. E-mail: mt.ramirez@ucm.es - rgomezhe@psi.ucm.es - fernando.rodriguez@ibima.eu

Recibido: 3-VIII-2015.  
Aceptado: 19-VIII-2015.

## Abreviaturas

DOHaD: Developmental Origins of Health and Disease Hypothesis o el origen del desarrollo de la salud y enfermedad.

GLUT4: Proteína transportadora de glucosa 4.

HPA: Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal.

PCK1: Gen del fosfoenolpiruvato carboxilquinasa.



## Introducción

En los últimos años, un gran número de estudios epidemiológicos y animales han apoyado la idea de que la exposición a ciertos estímulos, durante periodos críticos del desarrollo, puede incrementar el riesgo de desarrollar enfermedades en etapas posteriores de la vida. El término propuesto por Lucas, que se ha empleado para describir este proceso, ha sido el de programación o programming<sup>1</sup>, y se ha enmarcado dentro de la hipótesis de “El origen del desarrollo de la salud y enfermedad”, más conocida por su terminología en la lengua inglesa como “Developmental Origins of Health and Disease Hypothesis” (DOHaD)<sup>2-6</sup>.

En relación a las enfermedades que pueden verse programadas, se han señalado diversas patologías que podrían tener un origen en la vida temprana, como son las enfermedades de las vías respiratorias, cáncer o incluso algunas patologías psiquiátricas<sup>7-10</sup>. Sin embargo, la mayor parte de la investigación se ha centrado en las enfermedades cardiovasculares<sup>3,11-19</sup>, las cuales continúan siendo la primera causa de años de vida perdidos en todo el mundo. En concreto, las cardiopatías isquémicas ocupan el primer lugar, mientras que el accidente cerebro vascular se posiciona en tercer puesto<sup>20</sup>. Muy relacionadas con ellas se encuentran la obesidad y el síndrome metabólico.

En relación al momento en que se produce la programación, es preciso considerar el concepto de periodo o ventanas críticas del desarrollo. Un periodo crítico puede definirse como el momento en el tiempo en el que una experiencia afecta al organismo mucho más que en otro periodo de la vida, de ahí que se pueda producir un fallo en el progreso del desarrollo de un estadio al siguiente y ello pueda producir un déficit permanente<sup>21,22</sup>. Claramente, el periodo más estudiado ha sido el prenatal, del cual deriva el concepto de programación fetal, siendo el mismo crucial por producirse en él la formación y maduración de la mayoría de los órganos<sup>23</sup>. Sin embargo, el periodo en el cual se produce la programación podría ser más extenso<sup>24</sup>, habiendo probablemente más ventanas críticas que incluyan estadios de gran crecimiento, como son la lactancia e incluso la infancia y la pubertad, en los cuales el individuo puede resultar especialmente vulnerable<sup>25,26</sup>. También, los periodos pre-concepcional y pre-implantacional se han apuntado como elementos críticos en el desarrollo posterior de enfermedades. Esto ha sido evidenciado tras manipulaciones nutricionales en estos momentos<sup>27</sup> y también a través de la investigación en las técnicas de reproducción asistida, las cuales han mostrado que el medio donde el embrión es cultivado puede aumentar el riesgo de desarrollar características del síndrome metabólico en etapas posteriores de la vida<sup>28,29</sup>.

En lo que respecta a los estímulos que influyen en la programación, aunque se han identificado varios (exposición a ciertas hormonas, estrés, tabaco), se le ha concedido especial atención a los estímulos nutriciona-

les, y específicamente a la dieta materna. Para evaluar sus efectos, se han desarrollado estudios epidemiológicos y también se han empleado diversos modelos animales. Estos últimos han resultado particularmente útiles para identificar los mecanismos biológicos involucrados. A continuación se revisa el papel de la dieta materna en la programación metabólica y conductual, así como los mecanismos implicados en este proceso.

## Efectos de la subnutrición fetal: papel de la dieta materna restringida en la programación metabólica

Inicialmente, las primeras investigaciones se centraron en los efectos de la desnutrición o restricción calórica. Pero especialmente, la mayor parte de la investigación epidemiológica se ha realizado teniendo en cuenta el bajo peso al nacimiento, el cual es considerado como un indicador del ambiente nutricional durante la gestación. En este contexto, destacan las investigaciones realizadas por el epidemiólogo David Barker y su equipo, que a finales de los años 80 estudiaron una población británica nacida en Hertfordshire y Preston.

Barker y colaboradores, encontraron una gran correlación entre el bajo peso al nacimiento con el desarrollo de cardiopatía isquémica<sup>3</sup> y elevación de las cifras tensionales en la vida adulta, esto último a su vez relacionado con elevado peso de la placenta al nacimiento<sup>30</sup>. El bajo peso al nacer se asociaba además a elevación en los niveles de fibrinógeno<sup>31</sup> y con la intolerancia a la glucosa y desarrollo de diabetes tipo 2 en etapas posteriores de la vida, siendo éste último efecto especialmente evidente en sujetos obesos e hipertensos<sup>32</sup>. En general, observaron una elevada Odds ratio entre el bajo peso al nacimiento y el desarrollo posterior de síndrome metabólico, queriendo por ello renombrar al síndrome metabólico como “El síndrome del bebé pequeño”<sup>33</sup>. Todos estos datos les llevaron a proponer, la hipótesis del fenotipo ahorrador<sup>4,33</sup>.

Los estudios de Barker y colaboradores tomaban en consideración el bajo peso al nacer, y postulaban como principal factor etiológico de su teoría el déficit nutricional<sup>4</sup>. Sin embargo, no siempre el peso al nacimiento es un indicador del estado nutricional de la totalidad de la gestación. Una prueba de ello son los estudios derivados de la hambruna holandesa. La hambruna holandesa responde a una situación crítica producida los últimos 6 meses finales de la segunda guerra mundial, concretamente desde octubre de 1944 a mayo de 1945. Aunque la zona sur de Holanda ya había sido liberada por los aliados, la zona oeste de Holanda estaba aún ocupada bajo los nazis y sometida a un embargo de alimentos. A consecuencia de este bloqueo, y especialmente en las ciudades, las raciones de alimentos fueron drásticamente reducidas, siendo estas condiciones especialmente nefastas para las mujeres gestantes, su descendencia y los niños de corta edad. Parte de los individuos protagonistas de esta

dramática historia formaron parte de un estudio de cohortes, catalogado como un gran experimento humano por algunos investigadores, capaz de probar la hipótesis del origen fetal de algunas enfermedades<sup>34</sup>. De esta manera, a finales de los 70, Ravelli y colaboradores empezaron a estudiar la cohorte de la hambruna holandesa, poniendo en evidencia que los sujetos que habían nacido con normopeso, pero cuyas madres habían estado expuestas a la hambruna en la primera parte de la gestación, presentaban un mayor riesgo de obesidad abdominal a los 19 años que los expuestos en otros momentos de la gestación<sup>19</sup>. Años después, observaron que este hallazgo se mantenía al volver a estudiar a los sujetos a los 50 años<sup>18</sup>. Similarmente, el estudio desarrollado por Roseboom en la misma cohorte, puso de manifiesto el aumento en el riesgo de enfermedad coronaria en los expuestos a la hambruna en la primera parte de la gestación<sup>16</sup>. Por tanto, no sólo el bajo peso al nacer se relacionaba con alteraciones metabólicas en etapas posteriores de la vida, sino que el ambiente nutricional en periodos concretos de la gestación parecía tener un rol muy destacable en el proceso.

El ambiente postnatal también desempeña un papel importante en el riesgo de desarrollar enfermedades posteriormente. Así, diferentes estudios, especialmente los derivados de la cohorte de Helsinki, han mostrado como los individuos con rápido crecimiento postnatal, que habían nacido con bajo peso, presentaban mayor riesgo de desarrollar diabetes<sup>15</sup>, coronariopatía<sup>13</sup>, elevada morbilidad por cardiopatía isquémica<sup>35</sup> y adiposidad de rebote<sup>36</sup>. También el crecimiento compensador rápido, que sigue a una malnutrición temprana, ha sido señalado como un factor clave en el desarrollo posterior de una elevada adiposidad<sup>37,38</sup>, siendo ésta una característica del síndrome metabólico comúnmente encontrada en asociación con el bajo peso al nacimiento en diferentes estudios<sup>18,19,36,39</sup>. En conjunto, estos datos apoyan la hipótesis de la respuesta adaptativa de Gluckman, pues parece que el ambiente nutricional fetal deficiente hace que el individuo tenga que adaptarse a esas condiciones de ahorro a través de la programación, surgiendo problemas cuando el ambiente para el que está adaptado es distinto<sup>2</sup>.

Los modelos animales han logrado simular con éxito los efectos que la desnutrición provoca en humanos durante periodos críticos del desarrollo. En lo que a respecta a la creación de un ambiente restrictivo para el feto se han usado diferentes especies y varios métodos, tales como restringir la ingesta materna durante la gestación y/o lactancia, disminuir la ingesta proteica materna o ligar las arterias uterinas<sup>40</sup>. En relación a la restricción calórica, el periodo más estudiado ha sido la gestación. Cuando la restricción se implementa durante la misma, es común que la descendencia desarrolle después características del síndrome metabólico como mayor adiposidad<sup>41-46</sup>, alteración en el metabolismo de la glucosa<sup>41,47-51</sup>, dislipemia<sup>52</sup> o elevación de las cifras tensionales<sup>53</sup>. Otras características encontradas, han

sido alteración en el metabolismo de los glucocorticoides<sup>43,46,50</sup>, afectación del sistema nervioso simpático<sup>54</sup> o afectación de la leptina<sup>41,43,46,51</sup>, hallándose en algunos casos diferencias sexualmente dimórficas<sup>41,42,55</sup>.

### Efecto de la sobrenutrición fetal: papel de la dieta materna hipercalórica en la programación metabólica

Tras los iniciales estudios, que se centraron en el ambiente fetal deficiente, se empezó a contemplar el estudio de los efectos de la sobrenutrición fetal, en especial considerando que la obesidad y sobrepeso tienen elevada prevalencia también entre las mujeres en edad fértil, y que además, la nutrición materna y postnatal tiende a ser excesiva en las sociedades occidentales. Estos estudios, apoyaron la paradójica evidencia de que tanto la subnutrición como la sobrenutrición fetal van a incrementar en la descendencia el riesgo de desarrollar patologías metabólicas.

La obesidad materna y la diabetes gestacional son patologías vinculadas al exceso nutricional. Diferentes trabajos han mostrado como la obesidad materna se suele asociar a macrosomía al nacimiento<sup>56-59</sup> y a un elevado riesgo en la descendencia de sufrir obesidad o síndrome metabólico en etapas posteriores de la vida<sup>56,60-63</sup>. Similares resultados se encuentran en mujeres con diabetes gestacional, la cual es una patología íntimamente relacionada con la obesidad y sobrepeso materno<sup>64</sup>. Así, estas mujeres también presentan un mayor riesgo de tener niños con peso elevado para la edad gestacional al nacimiento<sup>59</sup> y posterior riesgo de enfermedades metabólicas<sup>56</sup>.

En lo que respecta a los estudios realizados en animales, con el fin de simular un ambiente obesogénico materno y estudiar los efectos en la descendencia, se han empleado dietas ricas en grasas<sup>65-67</sup>, ricas en azúcares simples<sup>68</sup>, ricas en grasas y carbohidratos<sup>69</sup> o dietas del estilo de cafetería, también llamadas comida basura<sup>70-72</sup>. La exposición a una dieta hipercalórica se ha asociado comúnmente a macrosomía o elevado peso al nacimiento en las crías, y ello ha sido evidenciado también en modelos animales<sup>69,73</sup>. Sin embargo, este hallazgo no se ha mantenido siempre, encontrándose que tanto la exposición a comida del estilo de cafetería<sup>71,74</sup> o incluso una dieta rica en grasas<sup>75-77</sup>, pueden ir asociadas a normo peso o incluso bajo peso al nacimiento.

Independientemente del peso al nacimiento, se ha encontrado relación entre la exposición a una dieta hipercalórica durante el periodo perinatal y la alteración de diferentes parámetros metabólicos en la descendencia en etapas posteriores de la vida<sup>66,67,69,75,78-82,82,83</sup>. Dentro de los parámetros afectados destacan el incremento en la adiposidad<sup>66,68,69,81,82,84</sup>, alteración en el metabolismo de la glucosa y/o insulina<sup>66-69,79,82,85-87</sup>, alteración del metabolismo lipídico<sup>67,68</sup> o elevación de las cifras tensionales<sup>66,69</sup>. Además, se han encontrado alteraciones hepáticas<sup>87</sup> y también, se han hallado respuestas

sexualmente dimórficas<sup>68,70,82,88</sup>, de forma similar a lo que sucedía en los modelos de restricción.

### Programación del comportamiento: papel de la dieta materna

El cerebro es especialmente sensible a los estímulos nutricionales en etapas tempranas del desarrollo. Dentro de los periodos críticos para el desarrollo cerebral, además del periodo que abarca desde el tercer trimestre de la gestación hasta los dos años de vida del niño, caracterizado por gran maduración y crecimiento cerebral<sup>89</sup>, se han destacado también como de gran relevancia los procesos tempranos de organización, que se producen desde el primer trimestre e incluyen la migración celular, diferenciación, neurogénesis, sinaptogénesis y maduración de las vías de neurotransmisión<sup>90</sup>. Dentro de los nutrientes, la adecuada ingesta calórica, la ingesta de proteínas, hierro, zinc, selenio, cobre, yodo, folatos, vitamina A, colina y ácidos grasos de cadena larga, han sido señalados por su especial relevancia en estos procesos<sup>89</sup>. De ahí, que una dieta inadecuada, que no provea de estos nutrientes principales en la cantidad adecuada durante este periodo crítico, pueda alterar la programación de las funciones cerebrales y por ende el comportamiento de forma irreversible.

Gran parte de la investigación que se ha realizado en este contexto, ha empleado modelos animales<sup>91</sup>, siendo en general los estudios humanos limitados a los efectos observados en poblaciones expuestas a hambrunas, o en sujetos que nacieron con bajo peso al nacimiento.

En lo que respecta a la programación de la conducta de la ingesta, algunos estudios han mostrado cómo la exposición a una dieta rica en grasas o la dieta del estilo de cafetería en momentos críticos del desarrollo pueden provocar hiperfagia<sup>68,69,71,71,72,75,83</sup> o neofobia alimentaria<sup>92</sup>. El incremento en el apetito en la descendencia, ha sido también evidenciado tras la exposición a restricción calórica en modelos animales<sup>41,50,53,93</sup>.

En lo que se refiere a la preferencia por comidas, diferentes investigaciones apuntan a la existencia de periodos críticos para la programación de las mismas. De esta manera, estudios realizados en humanos expuestos a hambrunas en el periodo perinatal o con crecimiento intrauterino restringido, han mostrado en etapas posteriores, una elevada preferencia por comida rica en grasas<sup>94</sup> o rica en azúcares<sup>95,96</sup>, que similarmente ha sido constatada en modelos animales<sup>41,43</sup>. En lo que respecta a las dietas hipercalóricas, también se ha documentado una elevada preferencia por comidas palatables tras la exposición perinatal a dietas del estilo de cafetería<sup>69,71,72</sup>. En relación a los periodos críticos, algunas investigaciones consideran que la gestación es un periodo especialmente vulnerable para el desarrollo de las preferencias alimentarias, al encontrarse una elevada correlación entre la ingesta energética y en macronutrientes materna en el embarazo, con la ingesta de

niños a los 10 años de edad<sup>97</sup>. Otros estudios apuntan también al periodo postnatal precoz, mostrándose una relación positiva entre el tipo de alimentos al que los niños han sido expuestos durante la gestación y lactancia, con las preferencias de los mismos en el periodo de destete<sup>98,99</sup>, y también evidenciándose como la exposición a ciertos sabores durante la lactancia aumenta la preferencia por alimentos específicos en la infancia<sup>100</sup>.

Aparte de las alteraciones en la conducta de la ingesta, han sido documentadas modificaciones en la respuesta emocional en modelos animales tras la exposición a una dieta materna hipercalórica<sup>69,92,101-104</sup>, una dieta de restricción proteica<sup>105,106</sup> o una dieta hipocalórica<sup>107-109</sup>. En general, se ha evidenciado que la exposición perinatal a una dieta rica en grasas aumenta las conductas relacionadas con la ansiedad, siendo este efecto similar independientemente de si los animales han sido expuestos durante la vida fetal o postnatal precoz<sup>92,102,104,110</sup>. En cambio, en algunos estudios realizados en modelos animales de restricción calórica, se ha mostrado que la exposición durante la gestación temprana y/o durante la lactancia aumenta las conductas relacionadas con la ansiedad con respecto a otros estadios de la gestación<sup>107-109,111</sup>. En el caso de la restricción proteica se ha encontrado, en general, que los animales expuestos a la misma durante la gestación exhiben mayor número de conductas exploratorias o gran impulsividad<sup>112</sup>, pero también se ha hallado el efecto contrario cuando la malnutrición proteica incluye tanto el periodo de lactancia como el de gestación<sup>105</sup>. En estos modelos, además, se han descrito modificaciones en comportamientos relacionados con la depresión<sup>105</sup>. En lo que respecta a estudios realizados en humanos, en los niños con bajo peso al nacimiento, también se ha evidenciado un elevado riesgo en el padecimiento de trastornos de ansiedad y/o trastornos del estado de ánimo<sup>113-115</sup>. Además, se ha encontrado una correlación elevada entre el IMC preconcepcional y obesidad materna con síntomas de desatención y emocionalidad negativa en niños<sup>116</sup>, lo cual también podría apoyar la hipótesis de que el estado metabólico materno aumenta el riesgo de desarrollar alteraciones conductuales en los hijos.

Otra parte de la investigación se ha centrado en el rendimiento cognitivo. Aunque existía inicialmente gran preocupación por los efectos en la salud observados en la población que había estado sometida a la hambruna holandesa, en la cual se había observado elevada prevalencia de trastornos de personalidad como aumentada prevalencia del trastorno esquizoide de la personalidad<sup>9</sup> o trastorno antisocial<sup>10</sup>, los estudios dirigidos a evaluar el rendimiento intelectual no hallaron alteraciones en los sujetos cuyas madres habían estado expuestas a la hambruna<sup>117</sup>. Posteriores investigaciones sí han mostrado correlación inversa entre el peso al nacimiento con déficits cognitivos<sup>118</sup>, aunque algunos autores destacan que el efecto del peso al nacimiento es menor cuando se controla la edad gestacional, encontrándose así en un metaanálisis un efecto más

moderado cuando se excluyen los niños que nacen prematuramente<sup>119</sup>. En cualquier caso, esta relación también ha sido constatada en modelos animales de restricción calórica<sup>107,109,120</sup>. Similarmente otros estudios epidemiológicos han asociado la obesidad y sobrepeso materno con peor desarrollo cognitivo en los niños<sup>121</sup>, encontrándose alteraciones en las funciones cognitivas en modelos animales de sobrenutrición o malnutrición proteica<sup>106,122,123</sup>.

### Mecanismos biológicos implicados en la programación metabólica y conductual

Diferentes estudios han profundizado en los mecanismos implicados en la programación metabólica y conductual en un intento de buscar hipótesis explicativas al proceso. Los modelos animales han resultado particularmente útiles para identificarlos. Mucha de la investigación realizada ha estudiado el papel de diferentes factores biológicos de forma separada. Sin embargo, muchos de estos mecanismos presentan importantes relaciones que sería necesario clarificar en un futuro. A continuación se describen algunos de ellos (Figura 1).

#### Fenómenos epigenéticos

Dentro de los mecanismos implicados en la programación ocupan un papel muy destacable los fenóme-

nos epigenéticos. Éstos son una característica esencial del desarrollo de los mamíferos, que causa alteraciones heredables y permanentes en la expresión génica, sin alterar la secuencia de ADN<sup>124,125</sup>. Dentro de este proceso se han identificado tres mecanismos epigenéticos principales interrelacionados, como son la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas, tales como acetilación y metilación, y el ARN no codificante, que afecta a la silenciación del ARN y la regulación post-transcripcional de la expresión génica e incluye el micro ARN, ARN transferente, ARN pequeño nuclear, ARN ribosomal, ARN interferente pequeño, ARN asociados a Piwi.<sup>124,126</sup> Estos mecanismos son susceptibles de verse modificados por diferentes estímulos, los cuales son capaces de provocar cambios en la expresión génica y aumentar la vulnerabilidad al desarrollo de ciertas enfermedades. Dentro de estos estímulos destacan los nutricionales, cuya investigación ha dado pie a la creación de un nuevo campo de estudio denominado Epigenoma nutricional<sup>127</sup>.

Algunos estudios realizados en humanos evidencian cambios epigenéticos tras la exposición a ambientes nutricionales inadecuados. Un ejemplo de ello, se encuentra en los sujetos nacidos de madres que padecieron la hambruna holandesa. Así, se ha mostrado que los individuos que estuvieron expuestos durante el periodo periconcepcional a la misma, presentaban posteriormente menor metilación del ADN para el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF-2)<sup>128</sup>. También se han observado al nacimiento, alteraciones en la metilación de genes específicos, asociados a condiciones nutricionales defi-

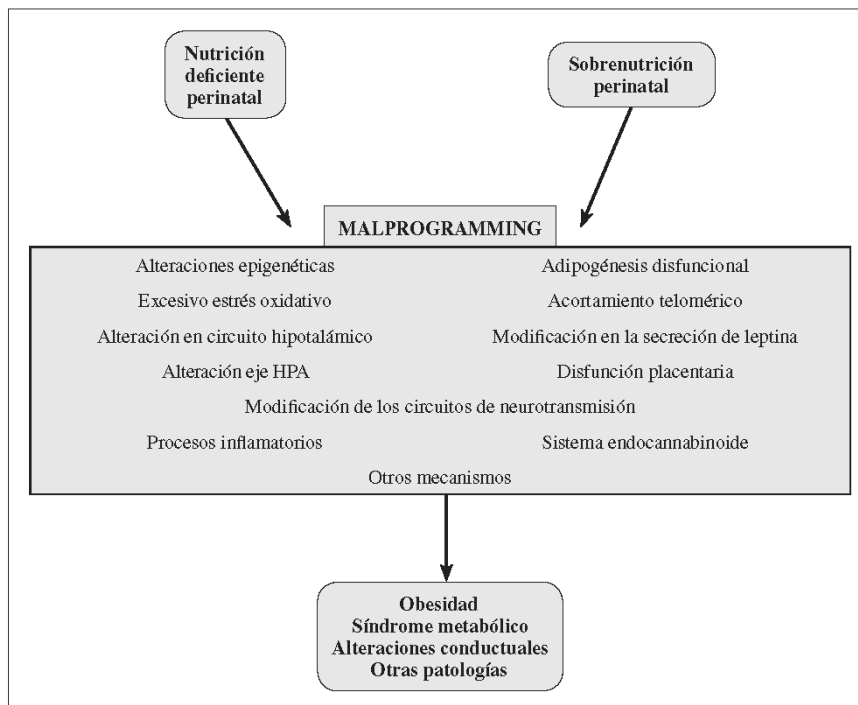


Fig. 1.—Mecanismos biológicos implicados en la programación metabólica y conductual.

cientes, en niños que desarrollaban en la infancia gran adiposidad. Específicamente, se ha encontrado una elevada correlación entre la adiposidad de los niños a los 9 años y la elevada metilación al nacimiento del gen RXRA, lo cual a su vez se ha asociado a baja ingesta de carbohidratos materna en la gestación temprana<sup>129</sup>.

Análogamente, los modelos animales han mostrado alteraciones epigenéticas tras la exposición materna a diferentes condiciones dietéticas. Respecto a las dietas hipoproteicas, algunos cambios epigenéticos encontrados afectaban a la expresión de neuropéptidos hipotálamicos, la expresión de leptina en tejido adiposo o la expresión de genes en hígado<sup>130-132</sup>. Tras la exposición a una dieta hipocalórica se han documentado también cambios epigenéticos asociados a la expresión de GLUT4, que es una proteína transportadora de glucosa regulada por la insulina, asociados a cambios en las histonas<sup>133</sup>, hipometilación en el promotor PCK1 del hígado, que está implicado en la gluconeogénesis<sup>134</sup>, o alteraciones en la metilación de genes lipogénicos hepáticos (Lxra)<sup>135</sup>. En relación a la exposición perinatal a dietas ricas en grasas altamente palatables, se han encontrado modificaciones epigenéticas en genes implicados en el sistema de recompensa<sup>136</sup> o en genes implicados en la regulación del ciclo celular, presentes en el hígado, que a su vez están relacionados con la disfunción hepática<sup>137</sup>.

#### *Excesivo estrés oxidativo*

Algunos autores han profundizado en el estudio del exceso de estrés oxidativo, proponiéndolo como un mecanismo biológico implicado en la programación<sup>138</sup>. Se piensa que el estrés oxidativo podría modular la expresión génica, probablemente provocando alteraciones epigenéticas, o podría actuar a través de los efectos indirectos en las moléculas oxidadas<sup>139</sup>, aumentando quizás de esta manera a la vulnerabilidad a enfermedades.

En lo que se refiere a evidencias en humanos que vinculen el estrés oxidativo con el riesgo posterior de desarrollar enfermedades metabólicas, se ha encontrado elevado estrés oxidativo en niños nacidos con bajo peso para la edad gestacional<sup>140</sup>. También se ha hallado excesivo estrés oxidativo en madres diabéticas, cuyos hijos también presentan riesgo aumentado de desarrollar síndrome metabólico en etapas posteriores de la vida<sup>141</sup>.

Similarmente, en modelos animales con exposición prenatal a dieta del estilo de cafetería<sup>142</sup> o en modelos en animales con malnutrición proteica<sup>143-145</sup>, se han encontrado evidencias de excesivo estrés oxidativo en la descendencia.

#### *Acortamiento de los telómeros: envejecimiento celular acelerado*

El estrés oxidativo influye en el acortamiento de los telómeros<sup>146,147</sup>, lo cual va asociado a envejecimiento celular. Algunos autores han mostrado acortamiento de

telómeros en la descendencia sometida a una dieta materna hipoproteica, en órganos como el páncreas o en las arterias aórticas<sup>147,148</sup>. De esta manera, un acelerado envejecimiento celular también podría considerarse como un mecanismo involucrado en la programación.

#### *Alteraciones en el circuito hipotalámico*

Las alteraciones en el circuito neuronal hipotalámico, también han sido documentadas. Esto resulta de especial relevancia, ya que el hipotálamo tiene un rol importante en la homeostasis energética, el apetito y la composición corporal. En animales expuestos a una dieta hipocalórica se han evidenciado alteraciones en este sistema<sup>50,149-152</sup>. Además, una dieta rica en grasas aumenta en la descendencia el número de neuronas que expresan péptidos orexígenos y los niveles de RNAm de este tipo de neuropéptidos<sup>65,88,153-156</sup>. De esta forma, estos cambios podrían contribuir a explicar algunos de las alteraciones observadas en la descendencia relacionadas con los patrones de apetito y distribución grasa.

#### *Modificaciones en la secreción de leptina*

La leptina ha sido vinculada al desarrollo del hipotálamo<sup>157,158</sup>. Específicamente, en roedores se ha propuesto que para el correcto desarrollo del hipotálamo debe producirse una liberación de leptina alrededor del 10º día postnatal<sup>159</sup>. Ese pico se ha relacionado con la diferenciación y migración neuronal y también con el establecimiento de fibras entre el núcleo arcuato, el paraventricular y el dorsomedial<sup>157,160,161,159</sup>. La desregularización de esta hormona del tejido adiposo ha sido documentada en numerosos trabajos, lo cual ha llevado a que algunos autores propusieran que esta hormona es crítica para el establecimiento de la programación<sup>162,163</sup>.

En humanos, se ha encontrado una correlación positiva entre el peso al nacimiento y niveles de leptina en el cordón umbilical<sup>164</sup>. Así, los recién nacidos de madres diabéticas o niños macrosómicos de madres no diabéticas presentan hiperleptinemia<sup>165-168</sup>, mientras que los niños con bajo peso para la edad gestacional exhiben hipoleptinemia<sup>130,169-171</sup>. Similarmente, se han hallado alteraciones de la leptina al nacimiento en modelos animales tras la exposición a dietas inadecuadas<sup>65,65,75,83,130,155</sup>. Los estudios realizados en crías cuyas madres fueron sometidas a restricción calórica han mostrado alteraciones en ese pico de liberación de leptina, en algunos casos produciéndose antes de tiempo<sup>44</sup> o incluso no produciéndose<sup>41</sup>, vinculándolo con alteraciones metabólicas e hipotalámicas posteriores.

Por otra parte, independientemente de los niveles de leptina en el periodo neonatal, tanto la sobrenutrición como la desnutrición en etapas tempranas de la vida, se han asociado a elevados niveles de leptina en la etapa adulta<sup>53,70,74,83,149,172-174</sup>. Además, algunos autores han

mostrado cómo el bloqueo de la acción de la leptina en la infancia temprana se ha asociado a leptin-resistencia y mayor adiposidad en la etapa adulta<sup>175</sup>, y cómo la administración de leptina postnatal ha podido revertir el desarrollo de una mala programación en crías con crecimiento intrauterino restringido provocado por desnutrición perinatal<sup>176</sup>. Todos estos datos ponen de manifiesto la importancia de la leptina en la programación de la homeostasis energética.

#### *Alteración del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA)*

La alteración del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, ha sido propuesta como un mecanismo explicativo de la programación. Se considera que este sistema es un mediador en la respuesta endocrina al estrés.

La idea general que subyace a la hipótesis de la implicación del eje HPA en la programación, es que la exposición a elevados niveles de glucocorticoides en momentos críticos del desarrollo, puede producir un incremento en el riesgo de padecer enfermedades en la etapa adulta. Diversas investigaciones, especialmente las realizadas en modelos animales, han mostrado cómo la exposición a excesivos glucocorticoides durante la gestación provocaba bajo peso al nacimiento y programaba hipertensión en la etapa adulta<sup>177,178</sup>. De forma similar, en humanos se ha documentado que el antecedente de bajo peso al nacimiento se asociaba a posterior elevación de corticoides y elevado riesgo de padecer hipertensión en la etapa adulta, además de mayor concentración de triglicéridos, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa<sup>179,180</sup>.

Posteriormente, y ya centrados en la nutrición materna deficiente en sí, la cual también puede considerarse como un estímulo estresante, los modelos animales de dieta materna restringida han mostrado alteraciones en este sistema en animales con bajo<sup>181,182</sup> y normopeso al nacimiento<sup>183,184</sup>, vinculándolas a posterior riesgo de enfermedades cardiometabólicas<sup>181,183</sup>. Otros estudios han ligado la alteración de este sistema con el riesgo de desarrollar trastornos de ansiedad tanto en modelos de restricción calórica<sup>185</sup> como en modelos de exposición materna a dietas ricas en grasas<sup>101,102</sup>.

#### *Disfunción placentaria*

La disfunción placentaria también ha sido propuesta como un mecanismo implicado en la programación. Algunos autores han señalado la relación entre el peso de la placenta al nacimiento con el riesgo de padecer hipertensión o coronariopatía en etapas posteriores de la vida<sup>30</sup>. También se ha observado que, en condiciones de desnutrición, la placenta tiende a ser pequeña pero a veces puede compensar su crecimiento expandiéndose, estando este aspecto relacionado con un estado nutricional bueno materno previo. Esta observación

ha sido particularmente clara en el caso de los varones, donde además se han encontrado diferencias con respecto a las mujeres en relación a la programación posterior de enfermedades en etapas posteriores de la vida<sup>186</sup>.

#### *Alteraciones en la adipogénesis*

El incremento de la adiposidad, encontrado tras la exposición a dietas durante el periodo perinatal, ha sido asociado a una regulación al alza de los circuitos de señalización adipogénica. En este sentido, se ha encontrado, tras la exposición a dietas nutricionales deficientes, una regulación al alza de los genes implicados en la diferenciación de adipocitos<sup>187</sup>, así como una elevación al alza de los factores de transcripción lipogénicos<sup>188</sup>. También se han documentado modificaciones en la innervación simpática del tejido adiposo<sup>54</sup>. Todos estos hallazgos podrían contribuir a la hipertrofia de adipocitos y almacenamiento de lípidos en estadios posteriores.

#### *Alteraciones en diferentes circuitos de neurotransmisión*

Diferentes estudios, realizados en modelos animales, han encontrado modificaciones conductuales asociadas a alteraciones en diferentes vías de neurotransmisión. Así, se ha asociado la alteración de la respuesta de la ansiedad, en modelos animales de sobrenutrición, con alteraciones en los circuitos implicados en la neurotransmisión gabaérgica y serotoninérgica, junto con alteraciones en el sistema HPA ya comentadas<sup>92,102,104</sup>. También la alteración en la actividad simpaticoadrenal junto con la disfunción del eje HPA, han sido propuestas en el incremento de la respuesta de ansiedad asociada a modelos de restricción calórica durante el periodo perinatal<sup>185,101</sup>.

En relación a la modificación de las preferencias por comidas, se han evidenciado cambios en la expresión de los receptores mu-opioides y transportadores de dopamina en el núcleo accumbens<sup>74,136</sup>, aparte de cambios en la expresión de la preproencefalina y la involucración de otras áreas como el córtex prefrontal o hipotálamo, todo ello asociado además a ciertos mecanismos epigenéticos como son la hipometilación del DNA de los genes implicados en los transportadores de dopamina, receptores mu opioides y preproencefalina<sup>136</sup>.

#### *Otros mecanismos*

Otros mecanismos alternativos que han sido propuestos como explicativos de la mala programación en los últimos años, han sido los procesos inflamatorios. Los mismos han sido involucrados en la génesis de enfermedades cardiovasculares, la disfunción placentaria

y también en el desarrollo de diferentes circuitos de neurotransmisión cruciales para la regulación conductual<sup>189,190</sup>.

Por último, recientemente algunas evidencias sostienen que el sistema endocannabinoide, altamente relacionado con varios de los mecanismos comentados previamente, podría jugar un papel importante en la programación metabólica y conductual<sup>191</sup>.

## Conclusiones

Las condiciones nutricionales adversas en periodos críticos del desarrollo y, específicamente, las dietas maternas inadecuadas, se vinculan con el desarrollo de enfermedades en la etapa adulta, en especial las enfermedades cardiovasculares, pero también con trastornos neuropsiquiátricos y alteraciones conductuales. Considerando que la dieta materna inadecuada es un factor de riesgo modificable, los hallazgos de los estudios epidemiológicos y en modelos animales subrayan el importante papel de las medidas preventivas implementadas desde periodos tempranos, que incluyan la pregestación, gestación y lactancia para prevenir estos procesos, pero también resulta evidente la necesidad de identificar los mecanismos involucrados, en especial considerando que comprender su papel puede ser útil a la hora de encontrar terapias que puedan revertir una mala programación. Aunque muchos de estos mecanismos ya están siendo investigados, presentan entre sí importantes relaciones que sería necesario clarificar en un futuro.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y competitividad (PSI-2012-35388), Instituto de Salud Carlos III y UE-ERDF (Número proyecto: CP12/03109). María Teresa Ramírez López ha sido beneficiaria de una beca predoctoral FPU del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

## Referencias

- Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 1991;156:38-50; discussion 50-5.
- Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2004 May-Jun;15(4):183-187.
- Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 1993 Jan;36(1):62-67.
- Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001;60:5-20.
- Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989 Sep 9;2(8663):577-580.
- Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995 Jul 15;311(6998):171-174.
- Lopuhaa CE, Roseboom TJ, Osmond C, Barker DJ, Ravelli AC, Bleker OP, et al. Atopy, lung function, and obstructive airways disease after prenatal exposure to famine. *Thorax* 2000 Jul;55(7):555-561.
- Painter RC, De Rooij SR, Bossuyt PM, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP, et al. A possible link between prenatal exposure to famine and breast cancer: a preliminary study. *Am J Hum Biol* 2006 Nov-Dec;18(6):853-856.
- Hoek HW, Susser E, Buck KA, Lumey LH, Lin SP, Gorman JM. Schizoid personality disorder after prenatal exposure to famine. *Am J Psychiatry* 1996 Dec;153(12):1637-1639.
- Neugebauer R, Hoek HW, Susser E. Prenatal exposure to wartime famine and development of antisocial personality disorder in early adulthood. *JAMA* 1999 Aug 4;282(5):455-462.
- Barker DJ. Birth weight and hypertension. *Hypertension* 2006 Sep;48(3):357-358.
- Barker DJ. The intrauterine origins of cardiovascular and obstructive lung disease in adult life. The Marc Daniels Lecture 1990. *J R Coll Physicians Lond* 1991 Apr;25(2):129-133.
- Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ. Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *BMJ* 2001 Apr 21;322(7292):949-953.
- Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ. Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *BMJ* 2001 Apr 21;322(7292):949-953.
- Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Jaddoe VW, Osmond C, Barker DJ. Effects of size at birth and childhood growth on the insulin resistance syndrome in elderly individuals. *Diabetologia* 2002 Mar;45(3):342-348.
- Roseboom TJ, van der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Ravelli AC, Schroeder-Tanka JM, et al. Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944-45. *Heart* 2000 Dec;84(6):595-598.
- Roseboom TJ, van der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Ravelli AC, Bleker OP. Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *Am J Clin Nutr* 2000 Nov;72(5):1101-1106.
- Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 1999 Nov;70(5):811-816.
- Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 1976 Aug 12;295(7):349-353.
- World Health Organization W. Global status report of non-communicable diseases 2014. Geneva: WHO Press, World Health Organization; 2014.
- Susser M, Levin B. Ordeals for the fetal programming hypothesis. The hypothesis largely survives one ordeal but not another. *BMJ* 1999 Apr 3;318(7188):885-886.
- Roseboom TJ. Prenatal exposure to the Dutch famine and health in later life: Amsterdam; 2000.
- Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 2007 May;261(5):412-417.
- Lucas A. Long-term programming effects of early nutrition -- implications for the preterm infant. *J Perinatol* 2005 May;25 Suppl 2:S2-6.
- Neu J, Hauser N, Douglas-Escobar M. *Postnatal nutrition and adult health programming Semin Fetal Neonatal Med* 2007 Feb;12(1):78-86.
- Frazier CR, Mason P, Zhuang X, Beeler JA. Sucrose exposure in early life alters adult motivation and weight gain. *PLoS One* 2008 Sep 17;3(9):e3221.
- Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 2000 Oct;127(19):4195-4202.
- Serrano A, Decara JM, Fernandez-Gonzalez R, Lopez-Cardona AP, Pavon FJ, Onio L, et al. Hyperplastic obesity and liver steatosis as long-term consequences of suboptimal in vitro culture of mouse embryos. *Biol Reprod* 2014 Aug;91(2):30.
- Watkins AJ, Platt D, Papenbrock T, Wilkins A, Eckert JJ, Kwong WY, et al. Mouse embryo culture induces changes in

- postnatal phenotype including raised systolic blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 Mar 27;104(13):5449-5454.
30. Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* 1990 Aug 4;301(6746):259-262.
  31. Barker DJ, Meade TW, Fall CH, Lee A, Osmond C, Phipps K, et al. Relation of fetal and infant growth to plasma fibrinogen and factor VII concentrations in adult life. *BMJ* 1992 Jan 18;304(6820):148-152.
  32. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 1991 Oct 26;303(6809):1019-1022.
  33. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992 Jul;35(7):595-601.
  34. Roseboom T, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev* 2006 Aug;82(8):485-491.
  35. Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C, Barker DJ. Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ* 1999 Feb 13;318(7181):427-431.
  36. Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ. Early adiposity rebound in childhood and risk of Type 2 diabetes in adult life. *Diabetologia* 2003 Feb;46(2):190-194.
  37. Bieswal F, Ahn MT, Reusens B, Holvoet P, Raes M, Rees WD, et al. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity* (Silver Spring) 2006 Aug;14(8):1330-1343.
  38. Bol VV, Delattre AI, Reusens B, Raes M, Remacle C. Forced catch-up growth after fetal protein restriction alters the adipose tissue gene expression program leading to obesity in adult mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009 Aug;297(2):R291-9.
  39. Valdez R, Athens MA, Thompson GH, Bradshaw BS, Stern MP. Birthweight and adult health outcomes in a biethnic population in the USA. *Diabetologia* 1994 Jun;37(6):624-631.
  40. Velkoska E, Morris MJ. Mechanisms behind early life nutrition and adult disease outcome. *World J Diabetes* 2011 Aug 15;2(8):127-132.
  41. Palou M, Priego T, Sanchez J, Palou A, Pico C. Sexual dimorphism in the lasting effects of moderate caloric restriction during gestation on energy homeostasis in rats is related with fetal programming of insulin and leptin resistance. *Nutr Metab (Lond)* 2010 Aug 26;7:69-7075-7-69.
  42. Suzuki M, Shibana M, Kimura S. Effect of severe maternal dietary restriction on growth and intra-abdominal adipose tissue weights in offspring rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2010;56(5):293-298.
  43. Lukaszewski MA, Mayeur S, Fajardy I, Delahaye F, Durtiez-Casteloot I, Montel V, et al. Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011 Sep;301(3):E548-59.
  44. Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, et al. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab* 2005 Jun;1(6):371-378.
  45. Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005 Jan;288(1):R91-6.
  46. Bispham J, Gopalakrishnan GS, Dandrea J, Wilson V, Budge H, Keisler DH, et al. Maternal endocrine adaptation throughout pregnancy to nutritional manipulation: consequences for maternal plasma leptin and cortisol and the programming of fetal adipose tissue development. *Endocrinology* 2003 Aug;144(8):3575-3585.
  47. Theys N, Ahn MT, Bouckenooghe T, Reusens B, Remacle C. Maternal malnutrition programs pancreatic islet mitochondrial dysfunction in the adult offspring. *J Nutr Biochem* 2011 Oct;22(10):985-994.
  48. Palou M, Koniczna J, Torrens JM, Sanchez J, Priego T, Fernandes ML, et al. Impaired insulin and leptin sensitivity in the offspring of moderate caloric-restricted dams during gestation is early programmed. *J Nutr Biochem* 2012 Dec;23(12):1627-1639.
  49. Jimenez-Chillaron JC, Hernandez-Valencia M, Reamer C, Fisher S, Joszi A, Hirshman M, et al. Beta-cell secretory dysfunction in the pathogenesis of low birth weight-associated diabetes: a murine model. *Diabetes* 2005 Mar;54(3):702-711.
  50. Breton C, Lukaszewski MA, Risold PY, Enache M, Guillemot J, Riviere G, et al. Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009 Mar;296(3):E462-72.
  51. Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000 Jul;279(1):E83-7.
  52. Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. *Am J Obstet Gynecol* 2007 Jun;196(6):555.e1-555.e7.
  53. Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000 Jul;279(1):E83-7.
  54. Garcia AP, Palou M, Sanchez J, Priego T, Palou A, Pico C. Moderate caloric restriction during gestation in rats alters adipose tissue sympathetic innervation and later adiposity in offspring. *PLoS One* 2011 Feb 18;6(2):e17313.
  55. Desai M, Babu J, Ross MG. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007 Dec;293(6):R2306-14.
  56. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 2005 Mar;115(3):e290-6.
  57. Baeten JM, Bukusi EA, Lambe M. Pregnancy complications and outcomes among overweight and obese nulliparous women. *Am J Public Health* 2001 Mar;91(3):436-440.
  58. Bhattacharya S, Campbell DM, Liston WA, Bhattacharya S. Effect of Body Mass Index on pregnancy outcomes in nulliparous women delivering singleton babies. *BMC Public Health* 2007 Jul 24;7:168.
  59. Ben-Haroush A, Hadar E, Chen R, Hod M, Yogev Y. Maternal obesity is a major risk factor for large-for-gestational-infants in pregnancies complicated by gestational diabetes. *Arch Gynecol Obstet* 2009 Apr;279(4):539-543.
  60. Catalano PM, Farrell K, Thomas A, Huston-Presley L, Mencin P, de Mouzon SH, et al. Perinatal risk factors for childhood obesity and metabolic dysregulation. *Am J Clin Nutr* 2009 Nov;90(5):1303-1313.
  61. Danielzik S, Langnase K, Mast M, Spethmann C, Muller MJ. Impact of parental BMI on the manifestation of overweight 5-7 year old children. *Eur J Nutr* 2002 Jun;41(3):132-138.
  62. Pirkola J, Pouta A, Bloigu A, Hartikainen AL, Laitinen J, Jarvelin MR, et al. Risks of overweight and abdominal obesity at age 16 years associated with prenatal exposures to maternal prepregnancy overweight and gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010 May;33(5):1115-1121.
  63. Olson CM, Demment MM, Carling SJ, Strawderman MS. Associations Between Mothers' and Their Children's Weights at 4 Years of Age. *Child Obes* 2010 Aug 1;6(4):201-207.
  64. Chu SY, Callaghan WM, Kim SY, Schmid CH, Lau J, England LJ, et al. Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2007 Aug;30(8):2070-2076.
  65. Chen H, Simar D, Morris MJ. Hypothalamic neuroendocrine circuitry is programmed by maternal obesity: interaction with postnatal nutritional environment. *PLoS One* 2009 Jul 16;4(7):e6259.
  66. Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L, et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005 Jan;288(1):R127-33.



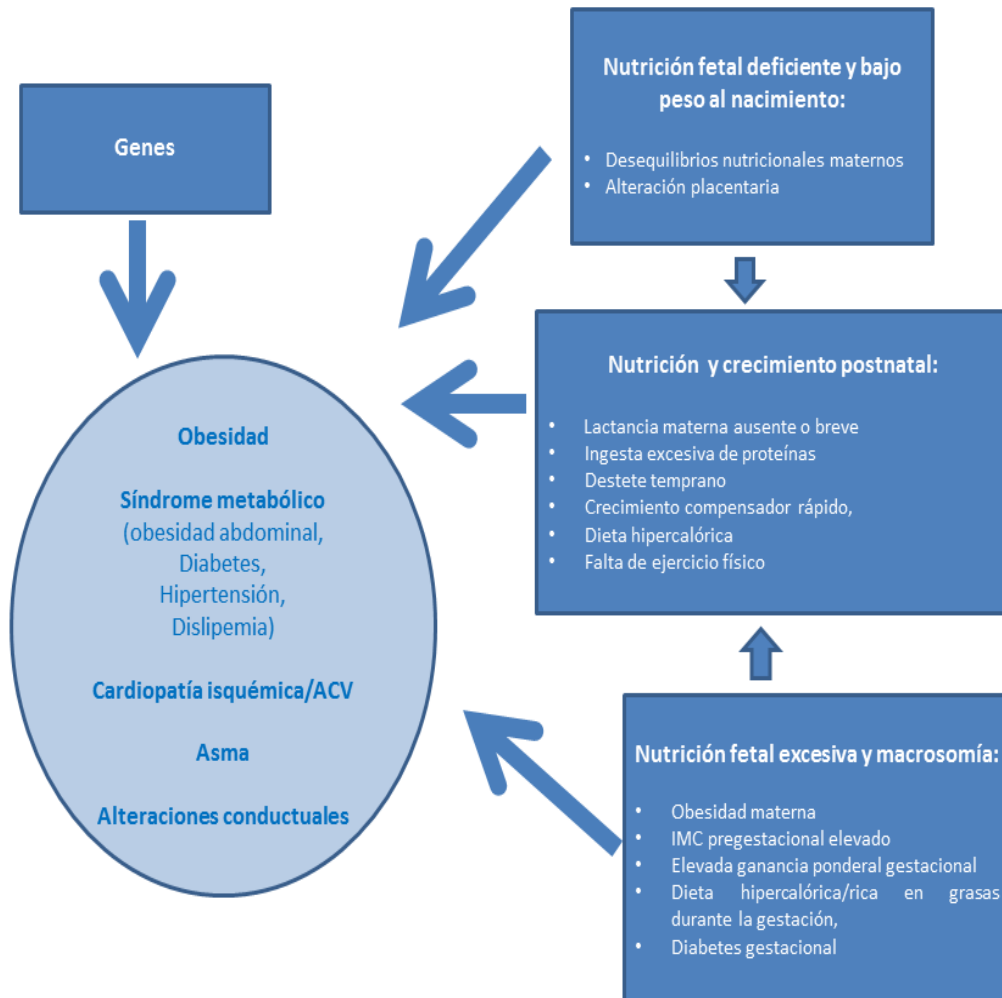
67. Srinivasan M, Katewa SD, Palaniyappan A, Pandya JD, Patel MS. Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006 Oct;291(4):E792-9.
68. Nivoit P, Morens C, Van Assche FA, Jansen E, Poston L, Remacle C, et al. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia* 2009 Jun;52(6):1133-1142.
69. Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH, et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension* 2008 Feb;51(2):383-392.
70. Bayol SA, Simbi BH, Bertrand JA, Stickland NC. Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females. *J Physiol* 2008 Jul 1;586(13):3219-3230.
71. Bayol SA, Farrington SJ, Stickland NC. A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Br J Nutr* 2007 Oct;98(4):843-851.
72. Ong ZY, Muhlhausler BS. Maternal "junk-food" feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *FASEB J* 2011 Jul;25(7):2167-2179.
73. Holemans K, Caluwaerts S, Poston L, Van Assche FA. Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 2004 Mar;190(3):858-865.
74. Ong ZY, Muhlhausler BS. Maternal "junk-food" feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *FASEB J* 2011 Jul;25(7):2167-2179.
75. Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol* 2009 Feb 15;587(Pt 4):905-915.
76. Guo F, Jen KL. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav* 1995 Apr;57(4):681-686.
77. Langley-Evans SC. Intrauterine programming of hypertension in the rat: nutrient interactions. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 1996 Aug;114(4):327-333.
78. Armitage JA, Taylor PD, Poston L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol* 2005 May 15;565(Pt 1):3-8.
79. Taylor PD, McConnell J, Khan IY, Holemans K, Lawrence KM, Asare-Anane H, et al. Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005 Jan;288(1):R134-9.
80. White CL, Purpera MN, Morrison CD. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009 May;296(5):R1464-72.
81. Shankar K, Harrell A, Liu X, Gilchrist JM, Ronis MJ, Badger TM. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008 Feb;294(2):R528-38.
82. Dahlhoff M, Pfister S, Blutke A, Rozman J, Klingenspor M, Deutsch MJ, et al. Peri-conceptional obesogenic exposure induces sex-specific programming of disease susceptibilities in adult mouse offspring. *Biochim Biophys Acta* 2014 Feb;1842(2):304-317.
83. Kirk SL, Samuelsson AM, Argenton M, Dhonye H, Kalamantianos T, Poston L, et al. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS One* 2009 Jun 11;4(6):e5870.
84. Krasnow SM, Nguyen ML, Marks DL. Increased maternal fat consumption during pregnancy alters body composition in neonatal mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011 Dec;301(6):E1243-53.
85. Srinivasan M, Mitrani P, Sadhanandan G, Dodds C, Shbeir-ElDika S, Thamotharan S, et al. A high-carbohydrate diet in the immediate postnatal life of rats induces adaptations predisposing to adult-onset obesity. *J Endocrinol* 2008 Jun;197(3):565-574.
86. Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol* 2009 Feb 15;587(Pt 4):905-915.
87. Gregorio BM, Souza-Mello V, Carvalho JJ, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguilu MB. Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. *Am J Obstet Gynecol* 2010 Nov;203(5):495.e1-495.e8.
88. Dearden L, Balthasar N. Sexual dimorphism in offspring glucose-sensitive hypothalamic gene expression and physiological responses to maternal high-fat diet feeding. *Endocrinology* 2014 Jun;155(6):2144-2154.
89. Georgieff MK. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. *Am J Clin Nutr* 2007 Feb;85(2):614S-620S.
90. Walker CD. Nutritional aspects modulating brain development and the responses to stress in early neonatal life. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005 Dec;29(8):1249-1263.
91. Laus MF, Vales LD, Costa TM, Almeida SS. Early postnatal protein-calorie malnutrition and cognition: a review of human and animal studies. *Int J Environ Res Public Health* 2011 Feb;8(2):590-612.
92. Peleg-Raibstein D, Luca E, Wolfrum C. Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. *Behav Brain Res* 2012 Aug 1;233(2):398-404.
93. Manuel-Apolinar L, Rocha L, Damasio L, Tesoro-Cruz E, Zarate A. Role of prenatal undernutrition in the expression of serotonin, dopamine and leptin receptors in adult mice: implications of food intake. *Mol Med Rep* 2014 Feb;9(2):407-412.
94. Lussana F, Painter RC, Ocke MC, Buller HR, Bossuyt PM, Roseboom TJ. Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. *Am J Clin Nutr* 2008 Dec;88(6):1648-1652.
95. Ayres C, Agranonik M, Portella AK, Filion F, Johnston CC, Silveira PP. Intrauterine growth restriction and the fetal programming of the hedonic response to sweet taste in newborn infants. *Int J Pediatr* 2012;2012:657379.
96. Barbieri MA, Portella AK, Silveira PP, Bettiol H, Agranonik M, Silva AA, et al. Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women. *Pediatr Res* 2009 Feb;65(2):215-220.
97. Brion MJ, Ness AR, Rogers I, Emmett P, Cribb V, Davey Smith G, et al. Maternal macronutrient and energy intakes in pregnancy and offspring intake at 10 y: exploring parental comparisons and prenatal effects. *Am J Clin Nutr* 2010 Mar;91(3):748-756.
98. Mennella JA, Jagnow CP, Beauchamp GK. Prenatal and postnatal flavor learning by human infants. *Pediatrics* 2001 Jun;107(6):E88.
99. Mennella JA, Griffin CE, Beauchamp GK. Flavor programming during infancy. *Pediatrics* 2004 Apr;113(4):840-845.
100. Mennella JA, Beauchamp GK. Flavor experiences during formula feeding are related to preferences during childhood. *Early Hum Dev* 2002 Jul;68(2):71-82.
101. Sasaki A, de Vega W, Sivanathan S, St-Cyr S, McGowan PO. Maternal high-fat diet alters anxiety behavior and glucocorticoid signaling in adolescent offspring. *Neuroscience* 2014 Jul 11;272:92-101.
102. Sasaki A, de Vega WC, St-Cyr S, Pan P, McGowan PO. Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. *Neuroscience* 2013 Jun 14;240:1-12.
103. Wright T, Langley-Evans SC, Voigt JP. The impact of maternal cafeteria diet on anxiety-related behaviour and exploration in the offspring. *Physiol Behav* 2011 May 3;103(2):164-172.
104. Sullivan EL, Grayson B, Takahashi D, Robertson N, Maier A, Bethea CL, et al. Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic sys-

- tem and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring. *J Neurosci* 2010 Mar 10;30(10):3826-3830.
105. Belluscio LM, Berardino BG, Ferroni NM, Ceruti JM, Canepa ET. Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors. *Physiol Behav* 2014 Apr 22;129:237-254.
  106. Reyes-Castro LA, Rodríguez JS, Charco R, Bautista CJ, Larea F, Nathanielsz PW, et al. Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. *Int J Dev Neurosci* 2012 Feb;30(1):39-45.
  107. Akitake Y, Katsuragi S, Hosokawa M, Mishima K, Ikeda T, Miyazato M, et al. Moderate maternal food restriction in mice impairs physical growth, behavior, and neurodevelopment of offspring. *Nutr Res* 2015 Jan;35(1):76-87.
  108. Levay EA, Paolini AG, Govic A, Hazi A, Penman J, Kent S. Anxiety-like behaviour in adult rats perinatally exposed to maternal calorie restriction. *Behav Brain Res* 2008 Aug 22;191(2):164-172.
  109. Erhard HW, Boissy A, Rae MT, Rhind SM. Effects of prenatal undernutrition on emotional reactivity and cognitive flexibility in adult sheep. *Behav Brain Res* 2004 May 5;151(1-2):25-35.
  110. Bolton JL, Bilbo SD. Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms. *Dialogues Clin Neurosci* 2014 Sep;16(3):307-320.
  111. Jaiswal AK, Upadhyay SN, Satyan KS, Bhattacharya SK. Behavioural effects of prenatal and postnatal undernutrition in rats. *Indian J Exp Biol* 1996 Dec;34(12):1216-1219.
  112. Almeida SS, Tonkiss J, Galler JR. Prenatal protein malnutrition affects exploratory behavior of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav* 1996 Aug;60(2):675-680.
  113. Nomura Y, Wickramaratne PJ, Pilowsky DJ, Newcorn JH, Bruder-Costello B, Davey C, et al. Low birth weight and risk of affective disorders and selected medical illness in offspring at high and low risk for depression. *Compr Psychiatry* 2007 Sep-Oct;48(5):470-478.
  114. Hack M, Youngstrom EA, Cartar L, Schluchter M, Taylor HG, Flannery D, et al. Behavioral outcomes and evidence of psychopathology among very low birth weight infants at age 20 years. *Pediatrics* 2004 Oct;114(4):932-940.
  115. Thompson C, Syddall H, Rodin I, Osmond C, Barker DJ. Birth weight and the risk of depressive disorder in late life. *Br J Psychiatry* 2001 Nov;179:450-455.
  116. Rodríguez A. Maternal pre-pregnancy obesity and risk for inattention and negative emotionality in children. *J Child Psychol Psychiatry* 2010 Feb;51(2):134-143.
  117. Stein Z, Susser M, Saenger G, Marolla F. Nutrition and mental performance. *Science* 1972 Nov 17;178(4062):708-713.
  118. Rickards AL, Kelly EA, Doyle LW, Callanan C. Cognition, academic progress, behavior and self-concept at 14 years of very low birth weight children. *J Dev Behav Pediatr* 2001 Feb;22(1):11-18.
  119. Shenkin SD, Starr JM, Deary IJ. Birth weight and cognitive ability in childhood: a systematic review. *Psychol Bull* 2004 Nov;130(6):989-1013.
  120. Zhang Y, Li N, Yang Z. Perinatal food restriction impaired spatial learning and memory behavior and decreased the density of nitric oxide synthase neurons in the hippocampus of adult male rat offspring. *Toxicol Lett* 2010 Mar 15;193(2):167-172.
  121. Casas M, Chatzi L, Carsin AE, Amiano P, Guxens M, Kogevinas M, et al. Maternal pre-pregnancy overweight and obesity, and child neuropsychological development: two Southern European birth cohort studies. *Int J Epidemiol* 2013 Apr;42(2):506-517.
  122. de Souza AS, Pacheco Lda C, Castro Pda S, Hókok JN, Rocha MS, do Carmo M. Brain fatty acid profiles and spatial learning in malnourished rats: effects of nutritional intervention. *Nutr Neurosci* 2008 Jun;11(3):119-127.
  123. Wu T, Deng S, Li WG, Yu Y, Li F, Mao M. Maternal obesity caused by overnutrition exposure leads to reversal learning deficits and striatal disturbance in rats. *PLoS One* 2013 Nov 4;8(11):e78876.
  124. Desai M, Jellyman JK, Ross MG. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)* 2015 Feb 2.
  125. Dolinoy DC, Jirtle RL. Environmental epigenomics in human health and disease. *Environ Mol Mutagen* 2008 Jan;49(1):4-8.
  126. Jimenez-Chillaron JC, Diaz R, Martinez D, Pentinat T, Ramon-Krauel M, Ribo S, et al. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie* 2012 Nov;94(11):2242-2263.
  127. Gallou-Kabani C, Junien C. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic. *Diabetes* 2005 Jul;54(7):1899-1906.
  128. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Nov 4;105(44):17046-17049.
  129. Godfrey KM, Sheppard A, Gluckman PD, Lillycrop KA, Burdge GC, McLean C, et al. Epigenetic gene promoter methylation at birth is associated with child's later adiposity. *Diabetes* 2011 May;60(5):1528-1534.
  130. Coupe B, Amarger V, Grit I, Benani A, Parnet P. Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology* 2010 Feb;151(2):702-713.
  131. Jousse C, Parry L, Lambert-Langlais S, Maurin AC, Averous J, Bruhat A, et al. Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome. *FASEB J* 2011 Sep;25(9):3271-3278.
  132. Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 2007 Mar;97(3):435-439.
  133. Raychaudhuri N, Raychaudhuri S, Thamocharan M, Devaskar SU. Histone code modifications repress glucose transporter 4 expression in the intrauterine growth-restricted offspring. *J Biol Chem* 2008 May 16;283(20):13611-13626.
  134. Nijland MJ, Mitsuya K, Li C, Ford S, McDonald TJ, Nathanielsz PW, et al. Epigenetic modification of fetal baboon hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase following exposure to moderately reduced nutrient availability. *J Physiol* 2010 Apr 15;588(Pt 8):1349-1359.
  135. Martinez D, Pentinat T, Ribo S, Daviaud C, Bloks VW, Cebria J, et al. In utero undernutrition in male mice programs liver lipid metabolism in the second-generation offspring involving altered Lxr DNA methylation. *Cell Metab* 2014 Jun 3;19(6):941-951.
  136. Vucetic Z, Kimmel J, Reyes TM. Chronic high-fat diet drives postnatal epigenetic regulation of mu-opioid receptor in the brain. *Neuropsychopharmacology* 2011 May;36(6):1199-1206.
  137. Dudley KJ, Sloboda DM, Connor KL, Beltrand J, Vickers MH. Offspring of mothers fed a high fat diet display hepatic cell cycle inhibition and associated changes in gene expression and DNA methylation. *PLoS One* 2011;6(7):e21662.
  138. Luo ZC, Fraser WD, Julien P, Deal CL, Audibert F, Smith GN, et al. Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress? *Med Hypotheses* 2006;66(1):38-44.
  139. Luo ZC, Xiao L, Nuyt AM. Mechanisms of developmental programming of the metabolic syndrome and related disorders. *World J Diabetes* 2010 Jul 15;1(3):89-98.
  140. Gupta P, Narang M, Banerjee BD, Basu S. Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: a case control study. *BMC Pediatr* 2004 Jul 20;4:14.
  141. Peuchant E, Brun JL, Rigalleau V, Dubourg L, Thomas MJ, Daniel JY, et al. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin Biochem* 2004 Apr;37(4):293-298.
  142. Bouanane S, Benkalfat NB, Baba Ahmed FZ, Merzouk H, Mokhtari NS, Merzouk SA, et al. Time course of changes in

- serum oxidant/antioxidant status in overfed obese rats and their offspring. *Clin Sci (Lond)* 2009 Apr;116(8):669-680.
143. Feoli AM, Siqueira IR, Almeida L, Tramontina AC, Vanzella C, Sbaraini S, et al. Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition* 2006 Feb;22(2):160-165.
  144. Feoli AM, Siqueira I, Almeida LM, Tramontina AC, Battu C, Wofchuk ST, et al. Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. *J Nutr* 2006 Sep;136(9):2357-2361.
  145. Bonatto F, Polydoro M, Andrades ME, da Frota Junior ML, Dal-Pizzol F, Rotta LN, et al. Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. *Brain Res* 2005 Apr 25;1042(1):17-22.
  146. von Zglinicki T, Martin-Ruiz CM. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr Mol Med* 2005 Mar;5(2):197-203.
  147. Tarry-Adkins JL, Martin-Gronert MS, Chen JH, Cripps RL, Ozanne SE. Maternal diet influences DNA damage, aortic telomere length, oxidative stress, and antioxidant defense capacity in rats. *FASEB J* 2008 Jun;22(6):2037-2044.
  148. Tarry-Adkins JL, Chen JH, Smith NS, Jones RH, Cherif H, Ozanne SE. Poor maternal nutrition followed by accelerated postnatal growth leads to telomere shortening and increased markers of cell senescence in rat islets. *FASEB J* 2009 May;23(5):1521-1528.
  149. Garcia AP, Palou M, Priego T, Sanchez J, Palou A, Pico C. Moderate caloric restriction during gestation results in lower arcuate nucleus NPY- and alphaMSH-neurons and impairs hypothalamic response to fed/fasting conditions in weaned rats. *Diabetes Obes Metab* 2010 May;12(5):403-413.
  150. Desai M, Li T, Ross MG. Hypothalamic neurosphere progenitor cells in low birth-weight rat newborns: neurotrophic effects of leptin and insulin. *Brain Res* 2011 Mar 10;1378:29-42.
  151. Manuel-Apollinar L, Zarate A, Rocha L, Hernandez M. Fetal malnutrition affects hypothalamic leptin receptor expression after birth in male mice. *Arch Med Res* 2010 May;41(4):240-245.
  152. Sebert SP, Hyatt MA, Chan LL, Patel N, Bell RC, Keisler D, et al. Maternal nutrient restriction between early and midgestation and its impact upon appetite regulation after juvenile obesity. *Endocrinology* 2009 Feb;150(2):634-641.
  153. Chang GQ, Gaysinskaya V, Karatayev O, Leibowitz SF. Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J Neurosci* 2008 Nov 12;28(46):12107-12119.
  154. Muhlausler BS, Adam CL, Findlay PA, Duffield JA, McMillen IC. Increased maternal nutrition alters development of the appetite-regulating network in the brain. *FASEB J* 2006 Jun;20(8):1257-1259.
  155. Gupta A, Srinivasan M, Thamadilok S, Patel MS. Hypothalamic alterations in fetuses of high fat diet-fed obese female rats. *J Endocrinol* 2009 Mar;200(3):293-300.
  156. Stachowiak EK, Srinivasan M, Stachowiak MK, Patel MS. Maternal obesity induced by a high fat diet causes altered cellular development in fetal brains suggestive of a predisposition of offspring to neurological disorders in later life. *Metab Brain Dis* 2013 Dec;28(4):721-725.
  157. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci* 2004 Mar 17;24(11):2797-2805.
  158. Cottrell EC, Cripps RL, Duncan JS, Barrett P, Mercer JG, Herwig A, et al. Developmental changes in hypothalamic leptin receptor: relationship with the postnatal leptin surge and energy balance neuropeptides in the postnatal rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009 Mar;296(3):R631-9.
  159. Ahima RS, Prabakaran D, Flier JS. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest* 1998 Mar 1;101(5):1020-1027.
  160. Ahima RS, Bjorbaek C, Osei S, Flier JS. Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology* 1999 Jun;140(6):2755-2762.
  161. Udagawa J, Hatta T, Hashimoto R, Otani H. Roles of leptin in prenatal and perinatal brain development. *Congenit Anom (Kyoto)* 2007 Sep;47(3):77-83.
  162. Vickers MH. Developmental programming and adult obesity: the role of leptin. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2007 Feb;14(1):17-22.
  163. Vickers MH, Sloboda DM. Leptin as mediator of the effects of developmental programming. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012 Oct;26(5):677-687.
  164. Koistinen HA, Koivisto VA, Andersson S, Karonen SL, Kontula K, Oksanen L, et al. Leptin concentration in cord blood correlates with intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 Oct;82(10):3328-3330.
  165. Shekhawat PS, Garland JS, Shivpuri C, Mick GJ, Sasidharan P, Pelz CJ, et al. Neonatal cord blood leptin: its relationship to birth weight, body mass index, maternal diabetes, and steroids. *Pediatr Res* 1998 Mar;43(3):338-343.
  166. Wiznitzer A, Furman B, Zuili I, Shany S, Reece EA, Mazor M. Cord leptin level and fetal macrosomia. *Obstet Gynecol* 2000 Nov;96(5 Pt 1):707-713.
  167. Brenseke B, Prater MR, Bahamonde J, Gutierrez JC. Current thoughts on maternal nutrition and fetal programming of the metabolic syndrome. *J Pregnancy* 2013;2013:368461.
  168. Lepercq J, Lahlou N, Timsit J, Girard J, Mouzon SH. Macrosomia revisited: ponderal index and leptin delineate subtypes of fetal overgrowth. *Am J Obstet Gynecol* 1999 Sep;181(3):621-625.
  169. Cetin I, Morpurgo PS, Radaelli T, Taricco E, Cortelazzi D, Bellotti M, et al. Fetal plasma leptin concentrations: relationship with different intrauterine growth patterns from 19 weeks to term. *Pediatr Res* 2000 Nov;48(5):646-651.
  170. Arslan M, Yazici G, Erdem A, Erdem M, Arslan EO, Himmetsoglou O. Endothelin 1 and leptin in the pathophysiology of intrauterine growth restriction. *Int J Gynaecol Obstet* 2004 Feb;84(2):120-126.
  171. Martinez-Cordero C, Amador-Licona N, Guizar-Mendoza JM, Hernandez-Mendez J, Ruelas-Orozco G. Body fat at birth and cord blood levels of insulin, adiponectin, leptin, and insulin-like growth factor-I in small-for-gestational-age infants. *Arch Med Res* 2006 May;37(4):490-494.
  172. Rolland-Cachera MF, Maillot M, Deheeger M, Souberbielle JC, Peneau S, Herberg S. Association of nutrition in early life with body fat and serum leptin at adult age. *Int J Obes (Lond)* 2013 Aug;37(8):1116-1122.
  173. Singhal A, Farooqi IS, O'Rahilly S, Cole TJ, Fewtrell M, Lucas A. Early nutrition and leptin concentrations in later life. *Am J Clin Nutr* 2002 Jun;75(6):993-999.
  174. Chen K, Yan J, Suo Y, Li J, Wang Q, Lv B. Nutritional status alters saccharin intake and sweet receptor mRNA expression in rat taste buds. *Brain Res* 2010 Apr 14;1325:53-62.
  175. Attig L, Solomon G, Ferezou J, Abdennebi-Najar L, Taouis M, Gertler A, et al. Early postnatal leptin blockade leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-induced obesity in rats. *Int J Obes (Lond)* 2008 Jul;32(7):1153-1160.
  176. Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cuffield WS, Gertler A, et al. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 2005 Oct;146(10):4211-4216.
  177. Dodic M, May CN, Wintour EM, Coghlan JP. An early prenatal exposure to excess glucocorticoid leads to hypertensive offspring in sheep. *Clin Sci (Lond)* 1998 Feb;94(2):149-155.
  178. Levitt NS, Lindsay RS, Holmes MC, Seckl JR. Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinology* 1996 Dec;64(6):412-418.
  179. Phillips DI, Walker BR, Reynolds RM, Flanagan DE, Wood PJ, Osmond C, et al. Low birth weight predicts elevated plasma cortisol concentrations in adults from 3 populations. *Hypertension* 2000 Jun;35(6):1301-1306.

180. Phillips DI, Barker DJ, Fall CH, Seckl JR, Whorwood CB, Wood PJ, et al. Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome? *J Clin Endocrinol Metab* 1998 Mar;83(3):757-760.
181. Poore KR, Boullin JP, Cleal JK, Newman JP, Noakes DE, Hanson MA, et al. Sex- and age-specific effects of nutrition in early gestation and early postnatal life on hypothalamo-pituitary-adrenal axis and sympathoadrenal function in adult sheep. *J Physiol* 2010 Jun 15;588(Pt 12):2219-2237.
182. Lingas R, Dean F, Matthews SG. Maternal nutrient restriction (48 h) modifies brain corticosteroid receptor expression and endocrine function in the fetal guinea pig. *Brain Res* 1999 Nov 6;846(2):236-242.
183. Bloomfield FH, Oliver MH, Giannoulis CD, Gluckman PD, Harding JE, Challis JR. Brief undernutrition in late-gestation sheep programs the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adult offspring. *Endocrinology* 2003 Jul;144(7):2933-2940.
184. Zhang S, Morrison JL, Gill A, Rattanaray L, MacLaughlin SM, Kleemann D, et al. Maternal dietary restriction during the periconceptional period in normal-weight or obese ewes results in adrenocortical hypertrophy, an up-regulation of the JAK/STAT and down-regulation of the IGF1R signaling pathways in the adrenal of the postnatal lamb. *Endocrinology* 2013 Dec;154(12):4650-4662.
185. Levay EA, Paolini AG, Govic A, Hazi A, Penman J, Kent S. HPA and sympathoadrenal activity of adult rats perinatally exposed to maternal mild calorie restriction. *Behav Brain Res* 2010 Mar 17;208(1):202-208.
186. Barker DJ, Eriksson JG, Kajantie E, Alwasel SH, Fall, C.H.D., Roseboom, T. J., Osmond C. The maternal and placental origins of chronic disease. In: Burton GJ, Barker DJ, Moffett A, Thornburg K, editors. *The Placenta and Human Developmental Programming*. Cambridge: Cambridge University Press; 2011. p. 5-12.
187. Guan H, Arany E, van Beek JP, Chamson-Reig A, Thyssen S, Hill DJ, et al. Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005 Apr;288(4):E663-73.
188. Desai M, Guang H, Ferelli M, Kallichanda N, Lane RH. Programmed upregulation of adipogenic transcription factors in intrauterine growth-restricted offspring. *Reprod Sci* 2008 Oct;15(8):785-796.
189. Sullivan EL, Nousen EK, Chamliou KA. Maternal high fat diet consumption during the perinatal period programs offspring behavior. *Physiol Behav* 2014 Jan 17;123:236-242.
190. Bolton JL, Bilbo SD. Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms. *Dialogues Clin Neurosci* 2014 Sep;16(3):307-320.
191. Keimpema E, Calvigioni D, Harkany T. Endocannabinoid signals in the developmental programming of delayed-onset neuropsychiatric and metabolic illnesses. *Biochem Soc Trans* 2013 Dec;41(6):1569-1576.

A modo de síntesis, en la **figura 3** se pueden observar los principales factores involucrados en el desarrollo de patologías metabólicas y trastornos conductuales, en los cuales las condiciones nutricionales presentan un papel destacado.



*Figura 3.* Factores relacionados con el desarrollo de la obesidad y otros trastornos. Modificado de Koletzko et al. (2013).



### 3. EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE: PAPEL EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO

#### 3.1 Concepto del sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (SEC) es un sistema de señalización lipídica altamente complejo, el cual está considerado como un mecanismo silencioso que se activa a demanda para mantener el equilibrio homeostático (Di Marzo, 2008; Di Marzo & Matias, 2005). Está compuesto por sus ligandos endógenos (principalmente anandamida y 2-araquidonil glicerol), sus receptores (especialmente CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>) y las enzimas necesarias para su síntesis y degradación (Di Marzo, 2008).

Su descubrimiento se produjo a partir de la identificación del principal responsable de las propiedades psicoactivas de la planta *Cannabis Sativa*, específicamente el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC), el cual fue descubierto en el año 1964 (Gaoni & Mechoulam, 1964). Años después, fueron hallados los receptores a los que el  $\Delta^9$ -THC se acoplaba para ejercer sus funciones, y así se descubrió en primer lugar el receptor cannabinoide tipo 1 (CB<sub>1</sub>) (Matsuda, Lolait, Brownstein, Young, & Bonner, 1990; Devane, Dysarz, Johnson, Melvin, & Howlett, 1988) y, posteriormente, el receptor cannabinoide tipo 2 (CB<sub>2</sub>) (Munro, Thomas, & Abu-Shaar, 1993). El siguiente paso fue la identificación de los ligandos endógenos para esos receptores recién descubiertos, a los cuales ya se les llamó endocannabinoides, y así fueron descritas la anandamida (AEA) (Devane et al., 1992) y el 2-araquidonil glicerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995) (**figura 4**). Desde ese momento, numerosos investigadores en todo el mundo continuaron investigando sobre estas sustancias y sus receptores, indagando en sus mecanismos de acción, su localización, y encontrándose que, tanto el cerebro como los órganos periféricos, expresaban los receptores y contenían y fabricaban las moléculas señalizadoras que a éstos se unían. Se llegó así a la conclusión de que todo ello formaba parte de un sistema que modulaba diferentes funciones del organismo (Howlett et al., 2002; Marsicano & Lutz, 2006). Además, considerando la necesidad de nuevas terapias para las diferentes patologías, se comenzó el estudio de su posible aplicación terapéutica.

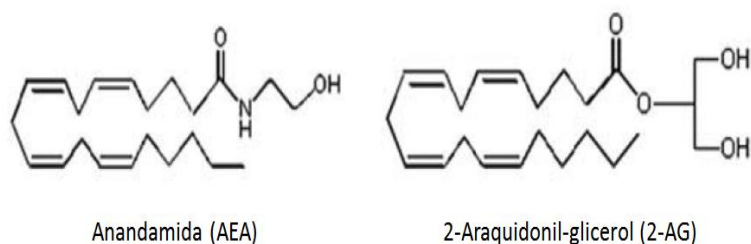


Figura 4. Estructura química de los principales endocannabinoides

### 3.2 Ligandos endógenos del sistema endocannabinoide: síntesis y degradación

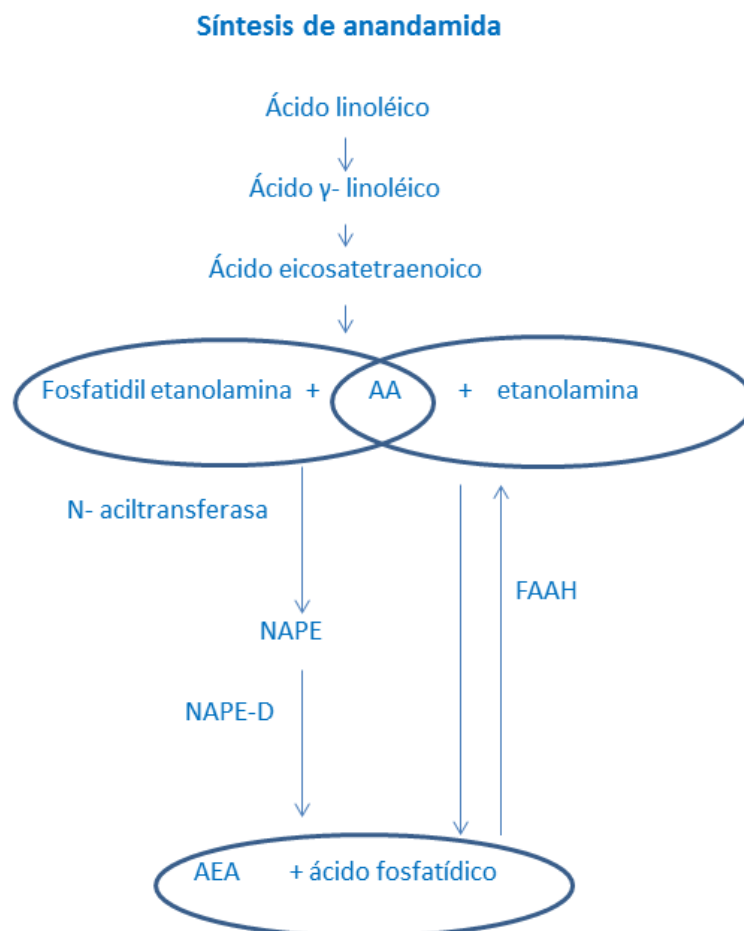
Los principales ligandos endógenos del sistema endocannabinoide son la AEA y el 2-AG (*figura 4*). La AEA presenta una elevada afinidad por los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> (Lin et al., 1998), mientras que el 2-AG muestra elevada afinidad tanto por los receptores CB<sub>1</sub> como por los CB<sub>2</sub> (Mechoulam et al., 1995). Inicialmente se pensaba que los endocannabinoides se generaban a demanda en respuesta a la actividad neuronal y tras su actividad eran hidrolizados (Mackie, 2008; Piomelli, 2003). Sin embargo, actualmente se sabe que los endocannabinoides como la AEA pueden almacenarse en vesículas (Oddi et al., 2008), aunque este sistema de almacenaje es menos relevante que la síntesis a demanda activada por despolarización celular.

Tanto la AEA como el 2-AG, son compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados, específicamente del ácido araquidónico (AA), cuyo precursor es un ácido graso esencial, el ácido linoléico. Para transformarse en AA, el ácido linoléico se transformará primero en ácido  $\gamma$ -linoleico y ácido eicosatetraenoico después. (Naughton, Mathai, Hryciw, & McAinch, 2013) (*figuras 5, 6*).

Respecto a la AEA, la misma será sintetizada a partir del AA. Para ello se emplearán diferentes vías: Una de ellas incluye la condensación del AA y etanolamida, por la actividad reversa de la enzima amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Naughton et al., 2013). La otra opción, que sería la principal, incluye la formación de la N-araquidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE). Esta molécula se produce por N-acilación de



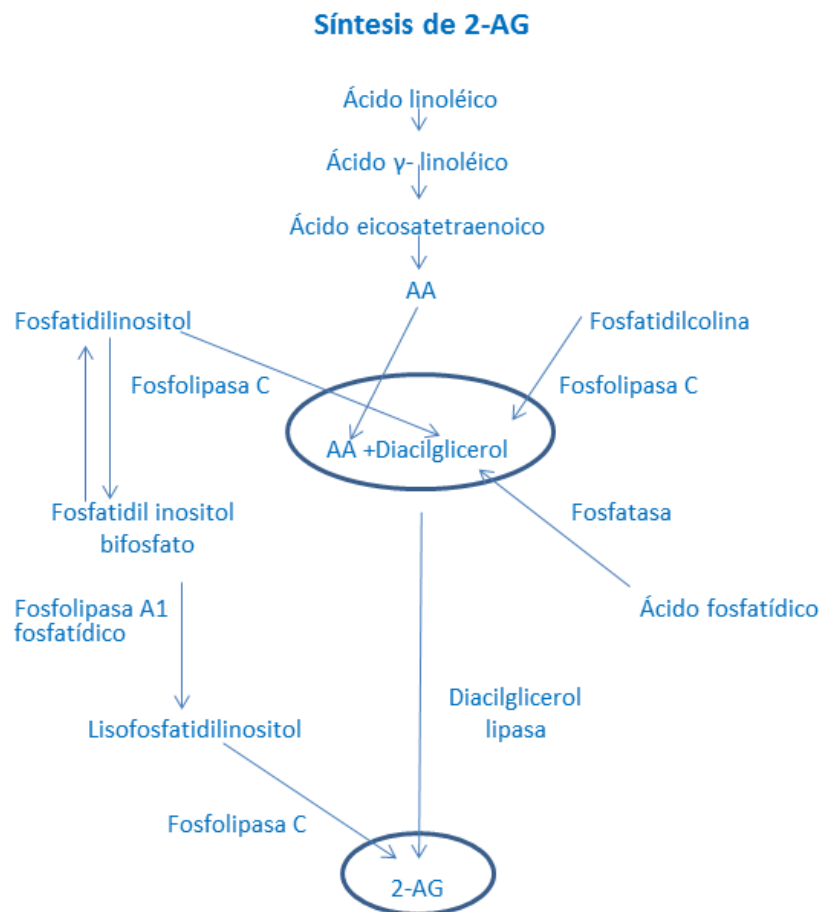
fosfatidiletanolamina con el ácido araquidónico a través de una enzima N-aciltransferasa. Después, la NAPE ya puede ser convertida en AEA (N-araquidononil-etanolamina) y ácido fosfatídico, a través de la acción de la N-acil-fosfatidiletanolamina-fosfolipasa D (NAPE-PLD) (Naughton et al., 2013; Sun et al., 2004; Cadas, di Tomaso, & Piomelli, 1997)(**figura 5**). En lo referente a su degradación, la enzima FAAH es la principal encargada, convirtiendo la AEA en sus precursores (AA y etanolamina) (Piomelli, 2003).



**Figura 5.** Síntesis de Anandamida. Adaptado de Naughton et al. (2013)

Con respecto al 2-araquidonilglicerol, el mismo puede ser sintetizado de diferentes formas, lo que explicaría su elevada concentración en el cerebro. Una de ellas, dependiente del AA, implica la conversión del diacilglicerol junto con el ácido araquidónico a 2-AG, vía diacilglicerol lipasa (Piomelli, 2003), bien diacilglicerol  $\alpha$  o  $\beta$  (Mazier, Saucisse, Gatta-Cherifi, & Cota, 2015). Para ello previamente el diacilglicerol se ha producido a partir del fosfatidilinositol, N-afosfatidilcolina o ácido fosfatídico, a partir de la acción de la enzima

fosfolipasa C, en el caso fosfatidilinositol, y la fosfatidilcolina, o la enzima fosfatasa, que transforma el ácido fosfatídico en diacilglicerol (Kondo et al., 1998). La otra vía posible, independiente del AA, es a partir del fosfatidilinositol. Aquí, una forma específica de la enzima fosfolipasa C, transforma esta molécula en fosfatidilinositolbifosfato. A través de la fosfolipasa A<sub>1</sub>, el fosfatidilinositolbifosfato se transformará en lisofosfatidilinositol y de ahí, a través de una fosfolipasa C, a 2-AG (Naughton et al., 2013) (*figura 6*). En relación al modo en que es hidrolizado el 2-AG, la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL) ocupa un papel destacable. La misma convierte el 2-AG en ácido araquidónico y glicerol (Dinh et al., 2002).



*Figura 6.* Síntesis de 2-AG. Adaptado de Naughton 2013 et al. (2013).

Aparte de la AEA y el 2-AG, otros ligandos que pueden activar los receptores cannabinoides son el noladín-éter (2-araquidonilglicerol éter), la N-araquidonil dopamina

(NADA) y la virodamina (Cota, Tschöp, Horvath, & Levine, 2006). También, muy relacionados con los endocannabinoides, se encuentran las N-aciletanolaminas (NAES), como son la OEA (Oleiletanolamida) o la palmitoiletanolamida (PEA). Estas moléculas, aunque no pueden considerarse en sí mismas endocannabinoides, comparten con la AEA enzimas de biosíntesis y degradación y regulan la homeostasis junto con los endocannabinoides (Bermudez-Silva, Viveros, McPartland, & Rodriguez de Fonseca, 2010).

### 3.3 Receptores cannabinoides

Los receptores cannabinoides (CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>) pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G, principalmente G<sub>i/o</sub>, los cuales se caracterizan por tener siete dominios transmembrana. Esta característica hace que muchos fármacos presenten afinidad por ellos y a su vez los hace atractivos por su potencial como dianas farmacéuticas (Filmore, 2004).

Los receptores CB<sub>1</sub> están altamente expresados en el sistema nervioso central, siendo comparable su densidad a la que exhiben los receptores glutamatérgicos y gabaérgicos (Alen, Ramirez-Lopez, Gomez de Heras, Rodriguez de Fonseca, & Orio, 2013; Howlett et al., 2002). Dentro de las áreas donde se expresan, destacan el córtex cerebral, el sistema límbico, los ganglios basales, el cerebelo, el hipotálamo y la médula espinal, habiendo diferencias en la expresión según la región y tipo de célula a la que van asociadas (Marsicano & Lutz, 1999; Herkenham et al., 1990). Pero también se han encontrado estos receptores en la periferia, en zonas relacionadas con el metabolismo como son el músculo, los adipocitos, el tracto gastro intestinal, el hígado o el páncreas, además de en las raíces de los ganglios nerviosos (Pagotto & Pasquali, 2006; Howlett et al., 2002).

Los receptores CB<sub>2</sub> se expresan principalmente en la periferia, especialmente en células inmunológicas y órganos como el timo, bazo, páncreas, amígdalas y otros órganos relacionados con el metabolismo, como el tejido adiposo o músculo esquelético. Estos receptores también pueden expresarse en áreas cerebrales como el hipotálamo, ganglios basales y sistema límbico (Bermudez-Silva, Viveros, McPartland, & Rodriguez de Fonseca, 2010; Onaivi et al., 2006; Howlett et al., 2002).

Otros receptores a los que se pueden unir los cannabinoides y las moléculas análogas, son el receptor vaniloide tipo 1 (TRPV<sub>1</sub>), el receptor activado por proliferadores de

peroxisomas tipo alfa y gamma (PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ ) y los receptores h́uerfanos acoplados a la protéina G como son el GPR<sub>55</sub>, los receptores GPR<sub>92</sub>, GPR<sub>18</sub> o GPR<sub>119</sub> (Alen, Ramirez-Lopez et al., 2013; Bermudez-Silva et al., 2010).

### **3.4 Funciones del sistema endocannabinoide**

La investigaci3n en el sistema endocannabinoide ha enfatizado en el rol que presenta en la modulaci3n de la neurotransmisi3n sináptica retr3grada. De esta manera, se ha estudiado que los endocannabinoides, una vez liberados en los terminales postsinápticos, pueden acoplarse a los receptores CB<sub>1</sub> presinápticos e inhibir la liberaci3n de neurotransmisores (Kano, Ohno-Shosaku, Hashimoto-dani, Uchigashima, & Watanabe, 2009; Wilson & Nicoll, 2001). Aś, diferentes estudios han mostrado la relaci3n entre la activaci3n de los receptores CB<sub>1</sub> y la liberaci3n de diferentes neurotransmisores como el glutamato, GABA, glicina, acetilcolina, norepinefrina, dopamina y colecistoquinina (Kano et al., 2009).

Tambi3n se ha documentado que la activaci3n de los receptores cannabinoides puede provocar efectos bifásicos en diferentes comportamientos, tales como la conducta de la ingesta, la actividad motora, los procesos motivacionales o respuestas de ansiedad, a menudo resultando en efectos opuestos y estando estos efectos asociados a la activaci3n de diferentes tipos de neuronas (excitatorias o inhibitorias) (Haring, Kaiser, Monory, & Lutz, 2011; Bellocchio et al., 2010; Viveros, Marco, & File, 2005; Wiley et al., 2005; Marco et al., 2004; Sulcova, Mechoulam, & Fride, 1998).

Además, el sistema endocannabinoide est́ implicado en un amplio repertorio de procesos fisiol3gicos sinápticos (Katona & Freund, 2012). Considerando esto, y con el objetivo de elucidar c3mo el sistema endocannabinoide contribuye en diferentes conductas, como el miedo, la memoria, habituaci3n o la conducta de la ingesta, los modelos de receptores Knock-out para receptores CB<sub>1</sub> espećficos seǵn el tipo de c3lula, han experimentado un importante desarrollo (Bellocchio et al., 2013; Ruehle et al., 2013; Steindel et al., 2013)

Aparte de la modulaci3n de la transmisi3n sináptica, el sistema endocannabinoide ejerce control en diferentes funciones, tales como los procesos sensoriales, el sueño, nocicepci3n, procesos cognitivos, neuroprotecci3n, neurodesarrollo, regulaci3n de la actividad motora o respuesta inflamatoria (Di Marzo, Ligresti, & Cristino, 2009; Marsicano & Lutz, 2006; Di Marzo & Matias, 2005). Especialmente importante es la participaci3n de este sistema en la

regulación del metabolismo energético y conducta de la ingesta (Cristino, Becker, & Di Marzo, 2014; Bermudez-Silva, Cardinal, & Cota, 2012; Pagotto & Pasquali, 2006; Di Marzo & Matias, 2005). Su desregulación, ha sido vinculada a patologías como la obesidad (Bermudez-Silva et al., 2010; Matias & Di Marzo, 2007) y/o enfermedades neuropsiquiátricas (Lutz, 2009).

### **3.5 Papel del sistema endocannabinoide en el metabolismo energético**

El sistema endocannabinoide juega un papel importante en la regulación del apetito, la ingesta y el peso corporal. Se ha considerado que el sistema orienta al balance energético hacia el almacenamiento energético, favoreciendo la adiposidad y el apetito (Bermudez-Silva et al., 2010). Así, se ha mostrado como el delta-9 tetrahidrocannabinol (cannabinoide exógeno) promueve hiperfagia en ratas presaciadas (Williams, Rogers, & Kirkham, 1998) y también como la anandamina (cannabinoide endógeno), aumenta el apetito actuando en los receptores CB<sub>1</sub> (Williams & Kirkham, 1999). Por el contrario, los antagonistas de los receptores cannabinoides (SR141716 o Rimonabant) provocan el efecto contrario (Williams & Kirkham, 1999). Además, la sobreactivación del sistema endocannabinoide, en especial con una regulación al alza del receptor CB<sub>1</sub> y un aumento de los niveles de endocannabinoides, se han asociado con la obesidad y el síndrome metabólico (Bermudez-Silva et al., 2010; Di Marzo et al., 2009; Matias & Di Marzo, 2007; Di Marzo & Matias, 2005).

Para el poder regular el metabolismo energético, el sistema endocannabinoide emplea mecanismos centrales y periféricos, los cuales van a actuar de manera coordinada (Alen, Ramirez-Lopez et al, 2013; Cota et al., 2003). A continuación se describen cada uno de ellos:

#### **3.5.1 Mecanismos centrales de regulación del metabolismo energético**

En el cerebro, los receptores endocannabinoides se van a encontrar en los terminales nerviosos, actuando de forma retrógrada para inhibir la liberación de neurotransmisores (Kano et al., 2009). Son varias partes del cerebro donde los endocannabinoides van a actuar

para regular el metabolismo a nivel central (*figura 7*). A continuación se describen:

### **3.5.1.1 El hipotálamo**

El hipotálamo tiene un rol importante en la homeostasis energética, el apetito y la composición corporal. Especialmente importantes en estas funciones son el núcleo arcuato (ARC), el núcleo paraventricular (PVN), el dorsomedial (DMH) y el área hipotalámica lateral (LHA). Concretamente el núcleo arcuato contiene neuronas orexígenas que expresan el neuropéptido Y (NPY), la proteína relacionada con agouti (AgRP) y también neuronas anorexígenas que expresan proopiomelanocortina (POMC), y el transcriptor regulador de cocaína y anfetamina (CART) (Morton, Cummings, Baskin, Barsh, & Schwartz, 2006; Wynne, Stanley, McGowan, & Bloom, 2005). Tanto la POMC como la AgRP, van a regular la actividad de los receptores de melanocortina localizados en el núcleo paraventricular (PVN), y van a formar parte del sistema hipotalámico de melanocortina (Cone, 2005).

El sistema endocannabinoide tiene un papel muy destacado en relación al hipotálamo y a la regulación central de la ingesta. Los receptores CB<sub>1</sub> se expresan en el núcleo arcuato, el núcleo paraventricular e hipotálamo lateral, de una forma menos extensa que en el resto del cerebro, pero con gran eficiencia para el intercambio e integración de señales entre los núcleos hipotalámicos, los órganos periféricos y el sistema nervioso simpático (Cristino et al., 2014; Alen, Ramirez-Lopez et al., 2013; Mackie, 2005). La forma en que están distribuidos los receptores, hace pensar que éstos pueden regular la expresión de péptidos orexígenos y anorexígenos. Así por ejemplo, en el núcleo arcuato los endocannabinoides actúan sobre la expresión del péptido anorexígeno CART (transcriptor regulado por anfetamina y cocaína) (Bermudez-Silva, Cardinal, & Cota, 2012; Di Marzo et al., 2009; Cota et al., 2003). También en este núcleo, las neuronas que producen proopiomelanocortina (POMC) y proteína relacionada con agouti (AgRP), son inervadas por terminales gabaérgicos que expresan receptores CB<sub>1</sub>. Ambos tipos de neuronas van a regular la actividad de los receptores de melanocortina del núcleo paraventricular de forma opuesta, formando parte del sistema hipotalámico de melanocortina (Cone, 2005). Además, en el núcleo paraventricular, la biosíntesis y acción de endocannabinoides va a depender de la liberación de glucocorticoides, que presentan propiedades orexígenas, pudiendo así inhibir la sinapsis glutamatérgica excitatoria, y de esta manera impedir la acción hormonal de los núcleos parvocelular y del núcleo magnocelular. En concreto, estos núcleos producen la hormona liberadora de corticotropina (CRH), con efecto anorexígeno, y la hormona

oxitocina y vasopresina respectivamente. Esta convergencia entre endocannabinoides, glucocorticoides y CRH es la base también de las respuestas de ansiedad asociadas a los trastornos alimentarios (Connan et al., 2007; Frieling et al., 2009). Por último, en el hipotálamo lateral los endocannabinoides actúan regulando la hormona concentradora de melanina (MCH) y orexinas, las cuales presentan propiedades orexígenas (Bermudez-Silva, Cardinal, & Cota, 2012; Di Marzo et al., 2009; Cota et al., 2003) (*figura 7*).

En el hipotálamo, los endocannabinoides en general van a disminuir la saciedad y aumentar las señales orexígenas (Bermudez-Silva et al., 2010), siendo varias las evidencias que muestran la importancia de los receptores cannabinoides y sus ligandos en la regulación de la ingesta. De esta manera, se ha visto que los niveles de 2-AG aumentan durante el ayuno y disminuyen en la saciedad en el hipotálamo y sistema límbico (Kirkham, Williams, Fezza, & Di Marzo, 2002). También se ha mostrado que la inyección de AEA dentro del área ventromedial hipotalámica produce hiperfagia en ratas presaciadas, siendo este efecto atenuado si se administra un antagonista cannabinoide como el rimonabant (Jamshidi & Taylor, 2001). Adicionalmente, los ratones knockout para CB<sub>1</sub>, los cuales muestran hipofagia y delgadez, presentan una expresión elevada de ARNm para la CRH en el núcleo paraventricular, lo que indica que los endocannabinoides regularían a la baja la expresión de CRH (Matias, Bisogno, & Di Marzo, 2006; Cota et al., 2003).

Se han argumentado varios motivos por los cuales los endocannabinoides tienen un efecto orexígeno, entre los cuales se plantea la posibilidad de la desinhibición de la hormona concentradora de melanina (MCH), la inhibición de las neuronas del núcleo paraventricular o también el control negativo de la hormona liberadora de corticotropina y CART, junto con la modulación positiva de la señalización orexígena-A en el núcleo arcuato (Alen, Ramirez-Lopez et al., 2013; Di Marzo et al., 2009; Di Marzo & Matias, 2005). Como ya se apuntaba previamente, parte de estas acciones las producen modulando la neurotransmisión retrógrada, de tal manera que inhiben o estimulan la liberación de neuropéptidos bien a través de la liberación o inhibición de glutamato o del GABA. En este proceso la leptina parece presentar un importante papel (Matias & Di Marzo, 2007).

En relación a la leptina y los endocannabinoides en el hipotálamo, son varias las evidencias que muestran su asociación. Parece que los niveles de endocannabinoides están bajo el control negativo de la leptina. De esta manera, se ha comprobado como los animales que son genéticamente obesos, por falta de receptor de leptina o falta de leptina, presentan

aumento en las concentraciones de cannabinoides en el hipotálamo (Di Marzo et al., 2001). En el hipotálamo lateral, que expresa neuronas orexígenas y neuronas MCH implicadas en aspectos motivacionales de la ingesta, se ha comprobado que los endocannabinoides suprimen la transmisión gabaérgica (inhibitoria) de esas neuronas orexígenas, favoreciendo así el efecto de las mismas. La leptina, por su parte, impide la entrada de calcio neuronal. Esta entrada de calcio en la neurona favorece la síntesis de endocannabinoides, de tal manera que la leptina finalmente a través de la inhibición de la entrada de calcio va a impedir la síntesis y la acción de los endocannabinoides (Jo, Chen, Chua, Talmage, & Role, 2005). También en el núcleo paraventricular, se ha comprobado cómo la leptina impide la formación de glucocorticoides, que a su vez estimulan la biosíntesis de endocannabinoides. La síntesis inhibida de endocannabinoides, por la ausencia de glucocorticoides, va a impedir que se produzca el efecto de los endocannabinoides a este nivel, que es principalmente inhibir la transmisión glutamatérgica y favorecer la ingesta (Malcher-Lopes et al., 2006).

Algo similar sucede con la grelina, la cual produce un aumento en los endocannabinoides hipotalámicos, requiriendo para ello de la integridad de los receptores CB<sub>1</sub> a ese nivel (Kola et al., 2008). Pero además la grelina, para ejercer sus efectos, aparte de los receptores centrales también parece necesitar los receptores CB1 periféricos (Alen et al., 2013).

### 3.5.1.2 El sistema límbico

El sistema límbico presenta un rol destacable en la función de regulación metabólica, por modular el placer hedónico y palatabilidad que proporcionan los alimentos y de esta manera incrementar la motivación por la comida (*figura 7*). En ese sentido es interesante el hecho de que los receptores CB1 se expresen en áreas implicadas en la valoración de aspectos hedónicos de las comidas y se conecten con áreas cerebrales relacionadas con el sistema de recompensa, el cual incluye la amígdala, el área tegmental ventral, el núcleo accumbens y el pallidum (Bermudez-Silva, Cardinal, & Cota, 2012; Harrold, Elliott, King, Widdowson, & Williams, 2002). Además, se ha propuesto que la actividad aumentada del sistema endocannabinoide determina el apetito por comidas altamente palatables, y ello, a su vez, repercute en la severidad de la obesidad inducida por dieta en modelos donde se ofrece libre elección entre comidas (Harrold et al., 2002).

Diversos estudios han implicado al sistema endocannabinoide en la respuesta nerviosa gustativa al sabor dulce o en la reacción hedónica ante el mismo, mostrando una mayor respuesta ante la administración de AEA, 2-AG o THC (De Luca, Solinas, Bimpisidis,



Goldberg, & Di Chiara, 2012; Yoshida et al., 2010) y un descenso cuando se administran antagonistas cannabinoides CB<sub>1</sub> (AM251) o en ratones Knock-out para CB<sub>1</sub> (Yoshida et al., 2010). El rol de los receptores CB<sub>1</sub> en la percepción de la palatabilidad, se ha comprobado también al observarse que los animales Knock-out para el receptor presentan menor ingesta de bebidas dulces en un paradigma de libre elección de bebidas o en un programa de reforzamiento, no habiendo diferencias con los ratones normales cuando se ofrece una bebida amarga (Sanchis-Segura, Cline, Marsicano, Lutz, & Spanagel, 2004).

Dentro del sistema límbico, se considera que el núcleo accumbens es clave en la percepción de la palatabilidad de las comidas, lo cual en parte está mediado por la activación del sistema opioide (Pecina & Berridge, 2000). Junto con el sistema opioide, el sistema endocannabinoide ha sido señalado por su capacidad para modular procesos como la recompensa y el apetito. Así, la distribución de los receptores CB<sub>1</sub>, los receptores opioides y sus ligandos endógenos, es muy similar en áreas del sistema mesocorticolímbico (Cota et al., 2006). Igualmente ocurre con el sistema dopaminérgico, cuyo circuito se sobrepone en muchas ocasiones con el del sistema endocannabinoide (Cota et al., 2007). La interacción entre ambos se ha puesto en evidencia al mostrarse como el THC incrementa las reacciones ante el sabor dulce y aumenta la liberación de dopamina en el “*Shell*” del núcleo accumbens, siendo este efecto abolido con la administración de antagonistas CB<sub>1</sub> y atenuado cuando, tras la administración repetida, se produce habituación (De Luca et al., 2012).

### 3.5.1.3 El bulbo olfatorio

También los receptores cannabinoides, presentes en bulbo olfatorio parecen presentar un importante papel en la ingesta. De este modo, se ha sugerido que los receptores CB<sub>1</sub>, a través del control de los procesos olfatorios, pueden jugar un papel determinante al acoplar la motivación de buscar alimentos con la ingesta de comida. En ese sentido, ha sido demostrado cómo la activación de los receptores cannabinoides en el bulbo olfatorio aumentan la ingesta de comida y la detección de olores en animales privados de comida, disminuyendo el nivel de excitación entre el bulbo olfatorio y la corteza olfatoria (Soria-Gomez et al., 2014) (*figura 7*). Dada la enorme diferencia entre el papel de la olfacción entre humanos y animales de experimentación, es difícil de saber hasta que punto este mecanismo es relevante en humanos.

### 3.5.1.4 El núcleo del tracto solitario

El núcleo del tracto solitario recibe información del nervio vago, a partir de las señales que se originan en el intestino en respuesta a la ingesta de comida. El núcleo del tracto solitario implicado también en la palatabilidad de las comidas, al recibir información gustativa proveniente de la cavidad oral. Desde esta estructura, las señales son derivadas a núcleo parabraquial pontino, participando así en la ingesta de comidas grasas y dulces junto con el sistema endocannabinoide. (Cristino et al., 2014) (figura 7). A su vez, el núcleo del tracto solitario va a proyectar al hipotálamo, formando parte del circuito regulador de la ingesta. En este circuito los receptores CB<sub>1</sub> y la señalización negativa de CCK van a participar de manera destacable (Burdyga et al., 2004).

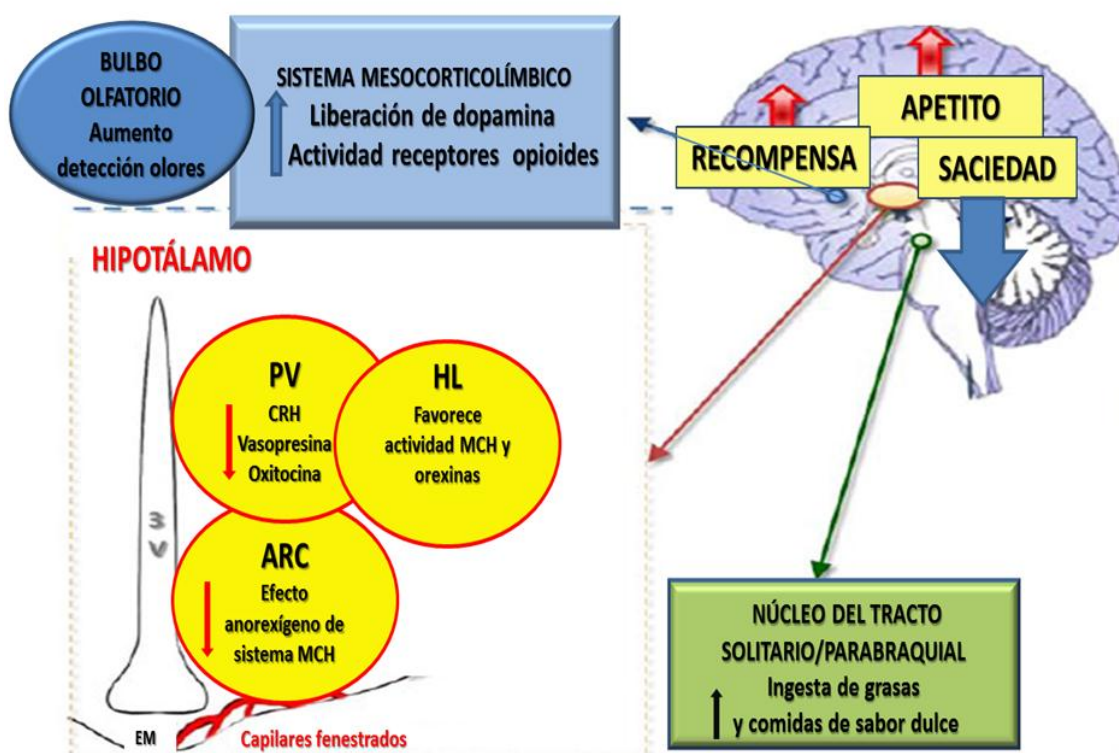


Figura 7. Efecto central de la sobreactivación del sistema endocannabinoide en el equilibrio energético. Abreviaturas: ARC: núcleo arcuato, PV: núcleo paraventricular, HL: hipotálamo lateral. Modificado de Cristino et al. (2014)

### 3.5.2 Mecanismos periféricos de regulación del metabolismo energético

Diferentes órganos periféricos involucrados en el metabolismo energético cuentan con receptores CB<sub>1</sub>, cuya activación promovería la lipogénesis y el almacenamiento de energía, además del apetito (Bermudez-Silva et al., 2010). El sistema endocannabinoide está también implicado en la modulación del metabolismo de la glucosa, promoviendo la secreción pancreática, lo cual favorece la captación de glucosa por tejidos como el hígado y el tejido adiposo, y ello a su vez favorece la síntesis de ácidos grasos y el almacenamiento de energía. (Cristino et al., 2014). A continuación se describe el papel del sistema endocannabinoide en diferentes órganos periféricos:

#### 3.5.2.1 Tejido adiposo

Los receptores cannabinoides en el tejido adiposo promueven la lipogénesis de diferentes maneras, entre las cuales se encuentra la diferenciación de los adipocitos o el aumento en la expresión de enzimas adipogénicas (Cristino et al., 2014; Bermudez-Silva, Cardinal, & Cota, 2012). El aumento del tejido adiposo promovido por los endocannabinoides también influye en la secreción de adipoquinas como la leptina, incrementándose su secreción, y la adiponectina, disminuyéndose sus niveles (Cristino et al., 2014). Ésta última, es una proteína asociada al tejido adiposo con efectos anti-inflamatorios y un papel protector contra la aterosclerosis (Goldstein & Scalia, 2004). La adiponectina induce la oxidación de ácidos grasos, la disminución de la glucemia e hiperinsulinemia y peso corporal, y se ha encontrado aumentada tras el antagonismo de los receptores CB<sub>1</sub> (Bensaid et al., 2003). La leptina inhibe los niveles de endocannabinoides en el tejido adiposo blanco, a través de su acción en el hipotálamo mediobasal. Sin embargo, en condiciones patológicas que llevan a la obesidad, donde suele haber hiperleptinemia, como ocurre tras la exposición prolongada a una dieta rica en grasas o falta de ejercicio, este mecanismo va a estar alterado (Silvestri & Di Marzo, 2013) (*figura 8*).

Los endocannabinoides también modulan la sensibilidad a la insulina en los adipocitos, favoreciéndola, y promoviendo así la acumulación de lípidos y energía. Para ello, la insulina va a favorecer la fosforilación de la proteína AKT. A través de ese proceso, los transportadores de glucosa GLUT 4 ya pueden redistribuirse hacia la membrana plasmática y así favorecer la captación de glucosa (Motaghedi & McGraw, 2008). En situaciones como

la obesidad, que suelen derivar en resistencia a la insulina y aumento de endocannabinoides, se piensa que este aumento de endocannabinoides podría ser un mecanismo inicialmente compensatorio para aumentar la eficiencia del sistema, mejorando la acción de la insulina. Sin embargo, ya posteriormente, la activación crónica del sistema, podría conducir a una disminución de la sensibilidad de la proteína AKT ante la activación de la insulina y provocar así la resistencia a la insulina (Motaghedi & McGraw, 2008).

Por otra parte, parece que el sistema endocannabinoide está implicado en el control de la diferenciación del tejido adiposo a un fenotipo similar a la grasa parda y en el gasto energético (Bermudez-Silva, Cardinal, & Cota, 2012). Así, el antagonismo de los receptores CB<sub>1</sub> hace que los adipocitos se vuelvan más termogénicos, con mayor sensibilidad a la insulina, además de propiciar un aumento de la biogénesis mitocondrial. Todos estos aspectos los va a hacer más similares a los adipocitos presentes en la grasa parda, la cual está implicada en el gasto energético (Perwitz et al., 2010). Específicamente, en la grasa parda el antagonismo de los receptores CB<sub>1</sub> aumenta la activación de temperatura en este tejido, además de aumentar la captación de glucosa por la estimulación con insulina (Bajzer et al., 2011). Por tanto, estos aspectos hacen pensar en la importancia del gasto energético a la hora de mediar los efectos de los cannabinoides.

### 3.5.2.2 Páncreas

En el páncreas, el sistema endocannabinoide está involucrado en la estimulación de la secreción de insulina y en la expansión de la masa de las células  $\beta$  (Cristino et al., 2014) (*figura 8*).

En cuanto al tipo de receptores localizados en esta estructura, se han encontrado tanto receptores los CB<sub>1</sub> como los CB<sub>2</sub> (Juan-Pico et al., 2006). Específicamente, en el páncreas humano, los receptores CB<sub>1</sub> se han localizado principalmente en las células  $\alpha$  pancreáticas, que segregan glucagón, pero también en las células  $\beta$ , encontrándose que su estimulación favorece tanto la secreción de insulina como de glucagón (Bermudez-Silva et al., 2008). Los receptores CB<sub>2</sub> en cambio, parecen responsables de disminuir la secreción de insulina tras su activación (Bermudez-Silva et al., 2008; Juan-Pico et al., 2006).

### 3.5.2.3 Hígado

En el hígado, se ha comprobado que la activación de receptores CB<sub>1</sub> va a inducir la acción de enzimas lipogénicas (Bermudez-Silva, Cardinal, & Cota, 2012). La lipogénesis hepática va asociada a la esteatosis hepática, en especial cuando hay una exposición a una dieta rica en grasas. Ésta a su vez va vinculada a la resistencia a la insulina y al síndrome metabólico (Cristino et al., 2014; Bugianesi, McCullough, & Marchesini, 2005).

El importante papel de los receptores CB<sub>1</sub> hepáticos ha sido puesto en evidencia al mostrarse cómo los ratones knock-out para CB<sub>1</sub>, en presencia de una dieta rica en grasas, pueden terminar desarrollando obesidad, y sin embargo presentar menos esteatosis, hiperglucemia, dislipemia e insulín y leptin-resistencia que los “*wild type*”. Por tanto, los receptores cannabinoides parecen jugar un importante rol en la regulación del metabolismo lipídido y en la severidad de las complicaciones inducidas por la dieta (Bermudez-Silva, Cardinal, & Cota, 2012; Osei-Hyiaman et al., 2005) (*figura 8*).

### 3.5.2.4 Músculo esquelético

El sistema endocannabinoide está presente en las células musculares (Crespillo et al., 2011). En cuanto a los efectos que pueden ejercer los endocannabinoides en el metabolismo muscular podría haber diferencias en función del tipo de músculo, especie y tipo de dieta (Maccarrone et al., 2015), aunque parece que en general el sistema endocannabinoide está implicado en el control de la energía y en la regulación del transporte de glucosa a nivel muscular (Maccarrone et al., 2015; Tibirica, 2010). Así, la activación de los receptores CB<sub>1</sub> en el músculo disminuye el transporte de glucosa, tanto basal como el estimulado por insulina, ocurriendo el efecto contrario cuando los receptores son bloqueados (Lindborg, Teachey, Jacob, & Henriksen, 2010). También el bloqueo de los receptores CB<sub>1</sub>, en roedores obesos, resulta en un aumento del gasto energético y consumo de oxígeno, estando estos aspectos relacionados con un aumento en el consumo de glucosa a nivel muscular, que va a favorecer la oxidación de ácidos grasos (Liu, Connoley, Wilson, & Stock, 2005). En estas células, los receptores CB<sub>1</sub> se encuentran en mitocondrias, donde se ha comprobado que regulan la vía glicolítica y la entrada de piruvato en el ciclo de Krebs (Arrabal et al., 2015).

Por otra parte, se ha señalado que los endocannabinoides podrían estar implicados en la formación de fibras musculares. En este proceso, junto con la reducción en la oxidación de

la glucosa ya comentada, los receptores CB<sub>1</sub>, así como la AEA y 2-AG parecen jugar un importante papel (Maccarrone et al., 2015).

### 3.5.2.5 Tracto gastrointestinal

El intestino también se encuentra involucrado en la regulación metabólica. Su rol en la modulación de la neurotransmisión entérica ha sido estudiado recientemente, encontrándose que puede utilizar dos tipos de mensajeros retrógrados, los propios endocannabinoides y también los nucleótidos de purina, controlando así la sinapsis entérica de forma opuesta (Hons et al., 2012).

Son varias las funciones en las que está implicado el tracto gastrointestinal en relación con los endocannabinoides: Por una parte, la señalización cannabinoide va a regular la motilidad gastrointestinal, la función de barrera, la función inmunológica y la ingesta, así como el equilibrio energético (**figura 8**). Pero también, los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, localizados en los nervios entéricos, en las células enteroendocrinas, células inmunológicas y el epitelio intestinal, van a modular la acción de los endocannabinoides, reduciendo la liberación de neurotransmisores, inhibiendo la liberación de hormonas entéricas, suprimiendo la activación inmunitaria y regulando las tight junction o unión estrecha entre células (Maccarrone et al., 2015).

La activación de los receptores cannabinoide, especialmente los receptores CB<sub>1</sub>, va a disminuir la motilidad gastrointestinal, disminuir el vaciamiento gástrico y suprimir la secreción ácida (Izzo & Sharkey, 2010). También la estimulación de los receptores puede ayudar a regular la liberación de péptidos entéricos, como es el caso de la colecistoquinina, que está implicada en la señalización del hambre (Maccarrone et al., 2015) (**figura 8**).

Por otra parte, la expresión de los receptores CB<sub>1</sub> va a estar regulada por la microbiota entérica, estando la activación de los mismos implicada en la permeabilidad del epitelio. Así, la activación de los receptores aumenta la permeabilidad del epitelio, disminuyendo las “tight junction” o unión estrecha entre células, favoreciendo el movimiento de bacterias y la endotoxemia metabólica que favorece la obesidad, mientras que el bloqueo de los receptores cannabinoide podría mejorar la función de la barrera intestinal (Maccarrone et al., 2015).

La existencia de mecanismos para el control de la ingesta en el intestino, fueron evidenciados tras demostrarse que la privación de comida aumentaba la concentración de

AEA en el intestino, sin afectar al cerebro, y además, al comprobarse que los efectos de los agonistas y antagonistas cannabinoides en la ingesta estaban mediados por receptores CB1 localizados en el intestino (Gómez et al., 2002). De forma contraria, la OEA, un análogo de los cannabinoides, presentaba concentraciones más bajas en el intestino con la privación de alimentos (Rodríguez de Fonseca et al., 2001). Esta N-aciletanolamina, que presenta propiedades anorexígenas, también parece estar implicada en la regulación de la ingesta periférica, pues sus acciones se producen cuando es administrada de forma periférica y no central y además sus efectos son bloqueados cuando las fibras sensoriales son abolidas por capsaicina (Rodríguez de Fonseca et al., 2001).

### 3.5.2.6 Sistema nervioso vegetativo

A través del nervio vago, que conecta el sistema gastrointestinal con la médula y el tronco cerebral, el sistema endocannabinoide interactúa con neuropéptidos y hormonas de acción orexígena secretadas en la periferia, como la grelina, o anorexígenas, como la leptina, la colecistoquinina, el PYY (péptido Y) o GLP-1 (péptido similar al glucagón tipo 1), para regular la ingesta de forma bidireccional: Por una parte el sistema endocannabinoide regula la expresión de estos neuropéptidos, pero también la síntesis y actividad del sistema endocannabinoide va a estar bajo el control de los mismos (Alen, Ramirez-Lopez et al., 2013; Matias et al., 2006). Aquí el sistema endocannabinoide va a reducir la saciedad.

Además, el sistema nervioso simpático está implicado en el balance energético y puede interactuar con la señalización cannabinoide central para regular el metabolismo, estando también implicado en la obesidad inducida por dieta (Quarta et al., 2010). De hecho, parece que es la activación del sistema nervioso simpático la que media la respuesta del rimonabant en la ingesta y las respuestas relacionadas con la ansiedad frecuentemente descritas con este compuesto (Bellocchio et al., 2013).

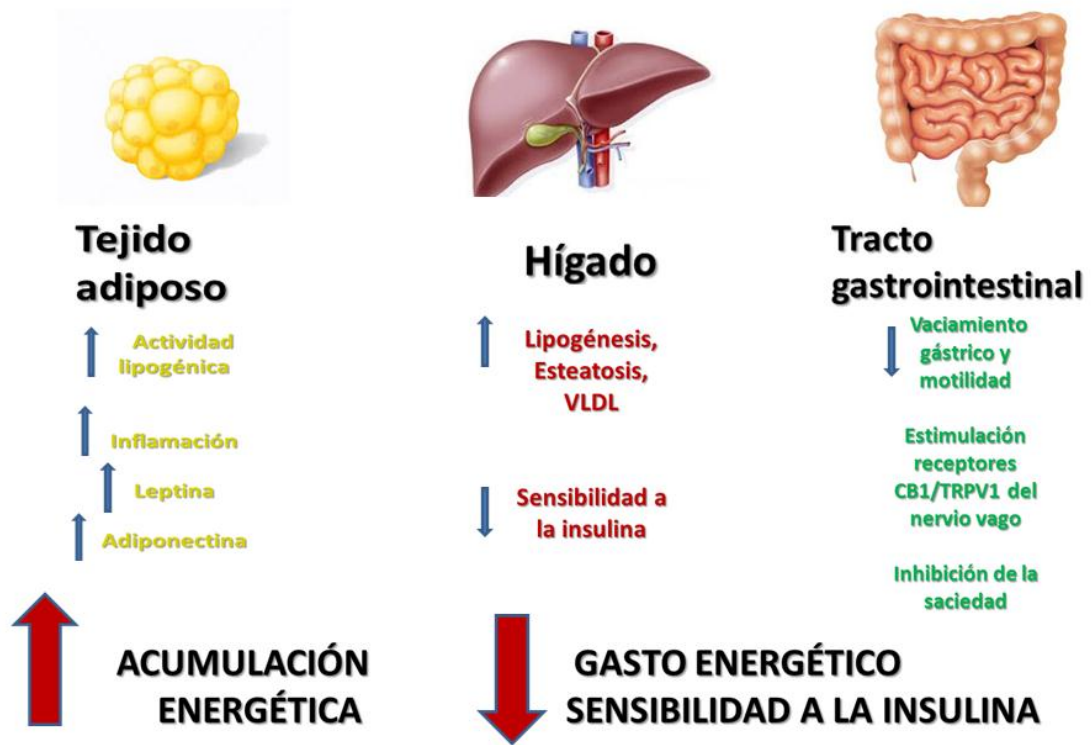


Figura 8. Efecto periférico de la sobreactivación del sistema endocannabinoide en el equilibrio energético. Modificado de Cristino et al. (2014) y Di Marzo & Matias (2005).



## 4. POSIBLE PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LA PROGRAMACIÓN METABÓLICA Y CONDUCTUAL

Hasta el momento en los previos apartados de la introducción se ha estado enfatizando la importancia de la programación nutricional y su vinculación con el desarrollo de enfermedades en la etapa adulta, haciendo especial hincapié en las enfermedades cardiovasculares. También se ha revisado cómo algunas enfermedades neuropsiquiátricas y alteraciones conductuales están relacionadas con ciertas condiciones nutricionales durante etapas tempranas. De todo ello se deja entrever el importante papel de las medidas preventivas implementadas desde periodos tempranos, que incluyan la pregestación, para prevenir estos procesos, pero también resulta evidente la necesidad de identificar los mecanismos involucrados, en especial considerando que comprender su papel puede ser útil a la hora de encontrar terapias que puedan revertir una mala programación. El sistema endocannabinoide, apenas estudiado en este contexto, se vislumbra como un nuevo mecanismo implicado en estos procesos, guardando además una estrecha relación con otros sistemas más estudiados y cuyo papel en la etiopatología del “*programming*” está más establecida. A continuación se señala la implicación del sistema endocannabinoide en diferentes aspectos vinculados a la programación.

### 4.1. El sistema endocannabinoide y el desarrollo perinatal

#### 4.1.1 La señalización cannabinoide durante la gestación

Tanto la deficiencia como la amplificación de la señalización cannabinoide pueden afectar el transcurso normal de la gestación, habiéndose encontrado alteraciones en el SEC en patologías obstétricas tales como el embarazo ectópico (Horne et al., 2008; H. Wang et al., 2004) o el aborto de repetición (Chamley et al., 2008). En estas situaciones se han visto especialmente envueltos los receptores CB<sub>1</sub> (Maccarrone et al., 2015). A continuación se revisan los estadios críticos donde el sistema endocannabinoide está especialmente

involucrado:

En el momento de la fertilización se ha mostrado que la activación de los receptores CB<sub>1</sub> van a inhibir la zona pelúcida, impidiendo así la fertilización del ovocito por más de un espermatozoide (Maccarrone et al., 2015). Inmediatamente después, los endocannabinoides también van a jugar un papel clave en el transporte del cigoto fecundado por el oviducto (Wang et al., 2004) (*figura 9*).

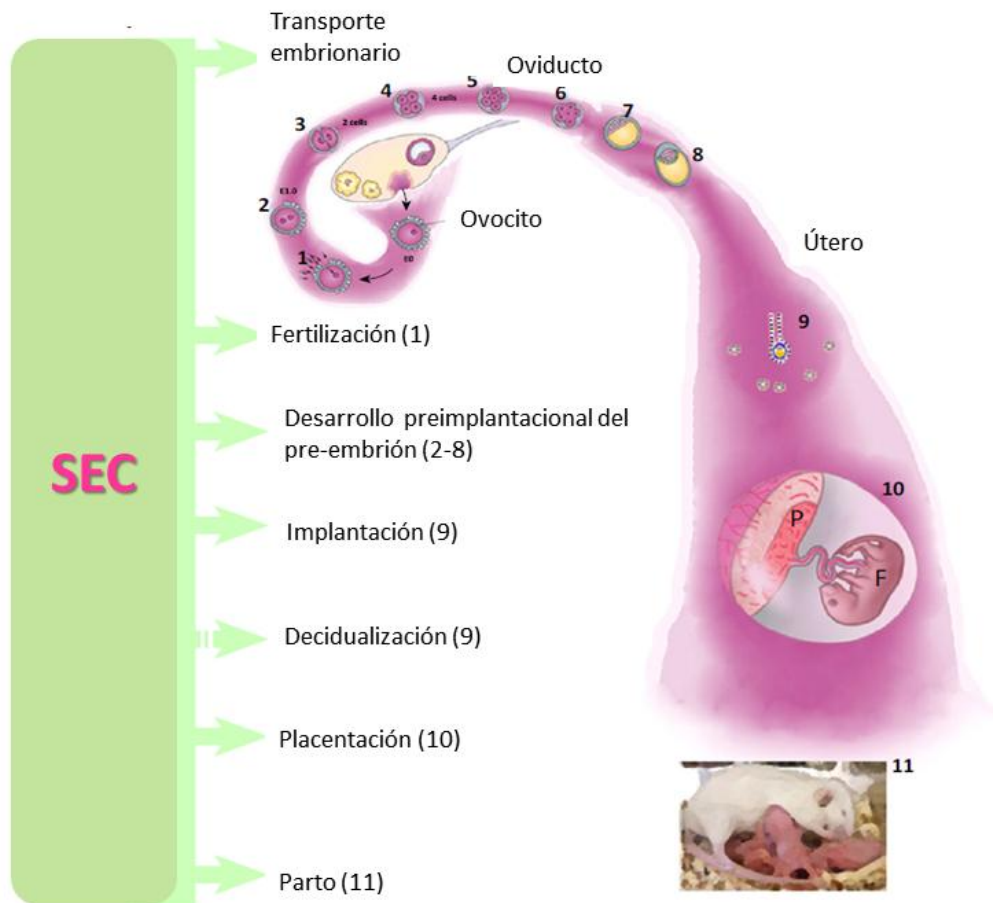
El siguiente paso importante es la implantación y decidualización. En este punto, se ha sugerido que un adecuado equilibrio en la señalización cannabinoide es fundamental para la sincronización entre el desarrollo del embrión previo a la implantación y la preparación del endometrio para la misma. Específicamente, las concentraciones uterinas de AEA en los días 4-6 de la gestación, van a influir en el éxito de la implantación del blastocisto en la cavidad uterina, de tal manera que unas concentraciones uterinas disminuidas junto con una regulación a la baja de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, van a favorecer el proceso, sucediendo lo contrario cuando esto no se produce (Paria et al., 2001). La enzima FAAH, que degrada la AEA, también ha mostrado su importancia en la implantación, habiéndose documentado que un exceso de FAAH correlaciona con abortos tempranos (Acone et al., 2009; Helliwell et al., 2004). En cuanto a la decidualización, que es el proceso implicado en la proliferación y diferenciación del estroma endometrial tras la implantación del blastocisto, la expresión de receptores cannabinoide en estas células apoya también la importancia de este sistema en el proceso (Fonseca et al., 2009) (*figura 9*).

En lo que respecta a la placentación, es importante señalar que la misma es crítica para el desarrollo fetal y el éxito de la gestación. En este proceso también el sistema endocannabinoide parece jugar un importante papel. Específicamente, los receptores cannabinoide se encuentran en el cono ectoplacentario, lugar donde las células se diferencian en células gigantes trofoblásticas y células trofoblásticas. La deficiencia en la señalización va a provocar una alteración en la diferenciación de las células madre trofoblásticas, produciendo a su vez alteraciones en la placentación y aumentando las reabsorciones fetales en roedores. Por otra parte, el exceso de señalización, aunque no afecta al tamaño placentario, sí se ha comprobado puede provocar alteraciones en el crecimiento fetal (Sun et al., 2010). Ambas situaciones, podrían afectar al proceso de programación y favorecer el desarrollo de enfermedades en etapas posteriores de la vida (*figura 9*).

Un aspecto de especial importancia para la programación es que a través de la placenta se produce la transferencia de sustancias nutritivas, incluyendo lípidos, de la madre al feto. Por otra parte, una alteración en la señalización cannabinoide podría afectar a su funcionalidad placentaria. En ese sentido es preciso considerar que la placenta podría modular la transferencia de endocannabinoides y/o sus precursores al feto (Keimpema, Calvigioni, & Harkany, 2013). Además de transportar glucosa, y aminoácidos, hay evidencias del paso placentario de los ácidos grasos poliinsaturados esenciales, como el ácido linoléico (18:2, $\omega$ -6) y el ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3, $\omega$ -3). Las concentraciones de estos ácidos grasos esenciales dependen exclusivamente de la ingesta materna y de la transferencia placentaria de los mismos, siendo por tanto los niveles hallados en el feto reflejo de los niveles maternos y de la capacidad de transporte placentario (Herrera, 2002). A partir del ácido linoléico, que es precursor del ácido araquidónico, se puede formar AEA y 2-AG, como se describía en apartados previos. Por tanto, los niveles fetales de endocannabinoides son susceptibles de ser modificados por la dieta materna, pudiendo también reflejar los niveles maternos. Pero también, las disregulaciones en los niveles de endocannabinoides podrían alterar la funcionalidad de la placenta como se comentaba anteriormente, y de ahí la transferencia de endocannabinoides y/o ácidos grasos precursores de los mismos. En apoyo de esta suposición, en primates, se han encontrado en hembras gestantes obesas niveles bajos de 2-AG con niveles elevados de AEA a nivel placentario (Brocato et al., 2013). Estos niveles alterados podrían afectar a la funcionalidad placentaria, y también ejercer influencia en la programación fetal.

Además, el sistema endocannabinoide (SEC) está implicado en el proceso de parto. De esta manera, se ha documentado que las concentraciones de AEA, que disminuyen después del primer trimestre, experimentan un ascenso en la proximidad del parto (Habayeb et al., 2004), encontrándose en los partos prematuros deficiencias en los receptores CB<sub>1</sub>, asociadas a niveles alterados de progesterona y estrógenos (Wang, Xie, & Dey, 2008).

Todos estos aspectos señalan la importancia de este sistema en la gestación, sugiriendo que las alteraciones en el mismo a su vez podría tener un impacto en la programación fetal.



*Figura 9.* Estadios críticos del desarrollo donde el sistema endocannabinoide (SEC) juega un importante papel. Cada número se corresponde con un estadio específico. La decidualización e implantación, comparten el mismo número por ser parte del mismo proceso. P: placenta F: Feto. Adaptado de Maccarrone et al. (2015).

#### 4.1.2 El sistema endocannabinoide en el periodo postnatal precoz

Se ha mostrado que el sistema endocannabinoide también tiene un rol muy importante en el inicio de la succión. Estos aspectos han resultado especialmente evidentes en las crías de ratón knock-out para el receptor  $CB_1$  y en las crías que han sufrido bloqueo de los receptores  $CB_1$  en las primeras 24 horas de vida, pues las mismas no presentan las características bandas de leche que pueden observarse de forma directa en el abdomen transparente de las crías durante los primeros días de vida, lo que indicaría falta de succión. Este aspecto además está vinculado a una menor supervivencia de los animales en el periodo neonatal, junto con un menor crecimiento (Fride et al., 2003; Fride et al., 2001).

Específicamente se ha propuesto que los niveles de 2-AG presentes en las crías recién

nacidas favorecerían la respuesta de succión. De esta manera, considerando que la leche materna también tiene 2-AG, al segundo día de vida se produciría un pico de este endocannabinoide en el cerebro, probablemente asociado al incremento en la ingesta de leche, que permitiría desarrollar la conducta de succión (Fride, 2004) y que a su vez podría tener impacto en el desarrollo del cerebro, como a continuación se explica.

### 4.1.3 El sistema endocannabinoide como factor importante en el desarrollo cerebral

El cerebro se ha resaltado, como se veía en anteriores apartados, como un órgano especialmente sensible a los estímulos nutricionales durante periodos críticos del desarrollo. En lo que respecta al papel del sistema endocannabinoide y el desarrollo del sistema nervioso, diferentes investigaciones han enfatizado su papel en el destino celular, en la proliferación neuronal, migración, elongación y guía de neuritas y sinaptogénesis (Keimpema et al., 2013; Gomez, Hernandez, & Fernandez-Ruiz, 2008).

Son varias las evidencias que muestran la importancia del SEC durante estos procesos, como por ejemplo el hecho de que la señalización cannabinoide y la expresión de receptores aparezca pronto en el cerebro. También en apoyo a esta idea se ha observado que la expresión de receptores es abundante en zonas que están implicadas en la proliferación neuronal y migración, habiéndose encontrado que los receptores se localizan temporalmente en zonas esenciales para la migración (Gomez et al., 2008). Además, los receptores cannabinoideos presentan una importante relación con células gliales que están implicadas en el desarrollo neuronal, como son los oligodendrocitos y astrocitos. Estos aspectos, unidos al hecho de que esa distribución atípica desaparece cuando se empieza a establecer la comunicación sináptica y se ha producido la selección de las dianas postsinápticas, apoya la idea de la importancia de este sistema en el desarrollo del cerebro (Fernandez-Ruiz, Berrendero, Hernandez, & Ramos, 2000).

En relación al modo en que el sistema endocannabinoide ejerce su rol en el cerebro en desarrollo, existen una serie de particularidades que lo diferencian del cerebro adulto. Por una parte, se ha destacado el papel que el mismo ejerce sobre las células en diferenciación, en las cuales adopta un mecanismo de acción autocrino (donde la célula se comunica consigo misma), a diferencia de lo que ocurre en la sinapsis adultas retrogradas, en las que hay una mecanismo de acción paracrino (por el cual se comunican varias células). También

en las neuronas progenitoras, en contraste a lo que ocurre en las neuronas diferenciadas, se coexpresan los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, habiendo interacción entre los mismos, pues los niveles de CB<sub>2</sub> van a provocar una regulación al alza de los receptores CB<sub>1</sub>. Además, la extensión de los niveles endocannabinoide en el cerebro en desarrollo está menos restringida que en el cerebro adulto. Por último, se ha señalado el papel importante de las enzimas de degradación, como son la FAAH o la MAGL, para limitar la señalización endocannabinoide. Todos estos aspectos apoyan la importancia del sistema para favorecer un correcto desarrollo cerebral (Maccarrone, Guzman, Mackie, Doherty, & Harkany, 2014).

Son varias las vías moleculares implicadas en el proceso de desarrollo cerebral activadas por la señalización cannabinoide. En ese sentido destacan las vías del fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K-AKT), las vías mTOR (diana de rapamicina en célula de mamífero) y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), así como la proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) o quinasas c-JUN N-terminal. Además, los receptores cannabinoide interactúan con la señalización de la neurotrofinas y netrin. En los procesos mencionados previamente, donde el sistema endocannabinoide ha mostrado tener un importante papel (proliferación neuronal, migración, elongación y guía de neuritas y sinaptogénesis), se ha enfatizado también el rol de las moléculas de adhesión a las células neurales, específicamente las moléculas L1 (Gomez, Hernandez, & Fernandez-Ruiz, 2007) (*figura 10*).

#### 4.1.3.1 Niveles de endocannabinoide durante el desarrollo cerebral

En lo que respecta a los niveles de endocannabinoide, durante la gestación las concentraciones de AEA en el cerebro fetal se van a mantener bajas hasta mitad de la gestación, momento en el cual los niveles empezarán a subir y continuarán en ascenso hasta la etapa adulta (Berrendero, Sepe, Ramos, Di Marzo, & Fernandez-Ruiz, 1999; Harkany et al., 2007). Por su parte, los valores de 2-AG cerebrales, van a mantenerse más estables, encontrándose en ratas que al GD 21 (día gestacional 21), los niveles son bastante similares a los encontrados en el adulto (Berrendero et al., 1999). En el periodo postnatal se han encontrado elevaciones crecientes de anandamida y NAPE, hasta llegar a los valores de la etapa adulta, mientras que los valores de 2-AG, que ya tenían valores similares a la etapa adulta desde el GD21, experimentan un pico importante al PN 1 (día postnatal 1) y luego ya se normalizan (Berrendero et al., 1999). Este pico de 2-AG podría estar relacionado con aspectos importantes del desarrollo cerebral (Berrendero et al., 1999).

#### 4.1.3.2 Receptores cannabinoides en el desarrollo cerebral

La síntesis de endocannabinoides está coordinada con la expresión de sus receptores (Berghuis et al., 2007). En cuanto a la distribución de los receptores cannabinoides, se ha encontrado una distribución creciente de los receptores cannabinoides, tanto en lo que respecta a su expresión como a su densidad, en diferentes áreas cerebrales desde el día de gestación 11 en ratones y la semana 14 de gestación en humanos (Harkany et al., 2007). Este hallazgo resulta especialmente importante, pues se corresponde con periodos en los que la mayoría de los neurotransmisores están ya presentes (Fernandez-Ruiz et al., 2000).

Un aspecto particularmente interesante es que los receptores en el cerebro en desarrollo se han localizado en lugares atípicos, no habituales en el cerebro adulto, lo que apoya la idea de que puedan estar implicados en eventos relacionados con el desarrollo del cerebro, como ya se comentaba previamente (Fernandez-Ruiz et al., 2000; Romero et al., 1997). Así, los receptores cannabinoides se han localizado en zonas de la sustancia blanca, como son las fibras comisurales del cerebro medio y tronco cerebral, o en zonas de proliferación celular, tales como la zona subventricular del estriado, el núcleo accumbens o neocórtex, participando en procesos de proliferación glial y neuronal. Además los receptores cannabinoides se han hallado en células gliales que presentan importantes roles en el desarrollo cerebral, tales como apoyo metabólico y trófico, secreción de factores neurotróficos, guía de la migración neuronal o elongación de axones y formación de mielina (Fernandez-Ruiz et al., 2000).

También es destacable, que se hayan encontrado elevados niveles de receptores CB<sub>1</sub> en los axones en desarrollo de ratones y humanos, llegando a desaparecer cuando se concluye la sinaptogénesis y se han seleccionado las dianas postsinápticas (Harkany et al., 2007). Pero además, la señalización endocannabinoide durante el desarrollo neuronal es bastante diferente del cerebro adulto, pues los receptores CB<sub>1</sub> y la enzima DAGL (diacilglicerol lipasa, que favorece la formación de 2-AG) están en todo el axón y dentro del cono axónico, facilitando así la extensión de las neuritas (Keimpema et al., 2013).

#### 4.1.3.3 Destino celular y supervivencia

Se ha señalado que los endocannabinoides podrían regular el destino final de las células neurales progenitoras, así como su supervivencia (Aguado et al., 2005; Guzman, Sanchez, & Galve-Roperh, 2002). En ese sentido es preciso comentar la importancia que posee que haya un adecuado equilibrio entre la muerte programada y la generación de adecuadas

cantidades de neuronas durante el desarrollo cerebral (Harkany et al., 2007). Pero además, la señalización endocannabinoide, originada en ambientes específicos, puede ofrecer señales extracelulares que guíen el destino de las células neuronales, además de favorecer la identidad neuronal y diversidad en el córtex cerebral. Así sucede con las células piramidales. De esta manera, cuando empieza a ser efectiva la señal endocannabinoide, que es cuando hay una importante expresión de los receptores CB<sub>1</sub>, es cuando las células progenitoras de la zona subventricular se comprometen para generar las células piramidales y los precursores del GABA, dirigiendo así la migración hacia el neocórtex (Harkany et al., 2007).

#### **4.1.3.4 Proliferación, diferenciación y neurogénesis**

Las células progenitoras neurales tienen capacidad de sintetizar endocannabinoides, receptores CB<sub>1</sub> funcionales y enzimas catabólicas, como la FAAH (Aguado et al., 2005). La activación de los receptores va a promover la proliferación de las células progenitoras, siendo estas acciones activadas con la presencia de adecuados niveles de AEA.

Por otra parte, la señalización endocannabinoide va a ejercer un importante papel en lo que respecta al destino celular de las células neurales, como se señalaba previamente, influyendo en si los precursores se diferenciarán en neuronas o glías, y favoreciendo específicamente la astrogliogénesis (Aguado et al., 2006; Aguado et al., 2005). Parece que en la proliferación de las células neurales los receptores CB<sub>1</sub> tienen un papel muy destacable así como la modulación que en los mismos ejerce el tono cannabinoide. Pero también el contexto en el que se produzca esa activación podría ser importante, favoreciéndose o no según las circunstancias el mantenimiento hacia un equilibrio entre neuronas-glia durante el desarrollo cerebral (Harkany et al., 2007). Pero no sólo los receptores CB<sub>1</sub> están implicados en este proceso. La activación de los receptores CB<sub>2</sub> se ha señalado como importante en la diferenciación de los oligodendrocitos y posterior formación de mielina (Arevalo-Martin et al., 2007).

Además, los endocannabinoides pueden modular la diferenciación endógena por la afectación directa o indirecta de intermediarios en las células vecinas. De este modo, los endocannabinoides afectan directamente a la diferenciación a través de la activación de ERK1/2 (quinasa regulada de señales extracelulares tipo 1 y 2) (Harkany et al., 2007).

Por último, es interesante comentar que el sistema endocannabinoide ejerce un importante



papel en el control de la generación de neuronas a partir de las células progenitoras, posiblemente facilitando o inhibiendo la formación de la mismas y encontrándose un papel facilitador, por ejemplo, en el caso de las neuronas piramidales (Gomez et al., 2008).

#### 4.1.3.5 Migración

Además de favorecer la gliogénesis, el sistema endocannabinoide favorece la migración neuronal, controlando la localización de las interneuronas y su integración durante la corticogénesis (Harkany et al., 2007). En las neuronas inmaduras, los endocannabinoides podrían presentar un papel facilitador en el proceso a través de la modificación de las interacciones en la adherencia entre neuronas y otros sustratos, como es el caso de la glía radial (Gomez et al., 2008).

Se ha comprobado que los endocannabinoides emplean el receptor CB<sub>1</sub> en el proceso de migración. Específicamente, su activación facilitaría la migración de las interneuronas a través del córtex cerebral, siendo su papel aditivo al papel que ejerce el BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) y promoviendo así la migración radial de las células piramidales celulares (Berghuis et al., 2005; Gomez et al., 2008). De esta manera, se ha encontrado que el receptor CB<sub>1</sub> se encuentra en estructuras específicas de la sustancia blanca implicadas en la migración junto con la presencia de la enzima FAAH en la glía radial (Aguado et al., 2006; Romero et al., 1997).

#### 4.1.3.6 Elongación de neuritas

Para la formación de neuronas maduras se requiere que haya un adecuado crecimiento de las neuritas, así como una correcta sinaptogénesis. En ese sentido se piensa que la señalización cannabinoide podría regular aspectos como la diferenciación y crecimiento del cono axónico y la guía axónica (Berghuis et al., 2007; M. Gomez et al., 2008; Harkany et al., 2007). El hallazgo temporal, durante el periodo fetal y postnatal de receptores cannabinoide en tractos de sustancia blanca implicadas en la elongación de axones, ha hecho pensar en la importancia de este sistema (Romero et al., 1997).

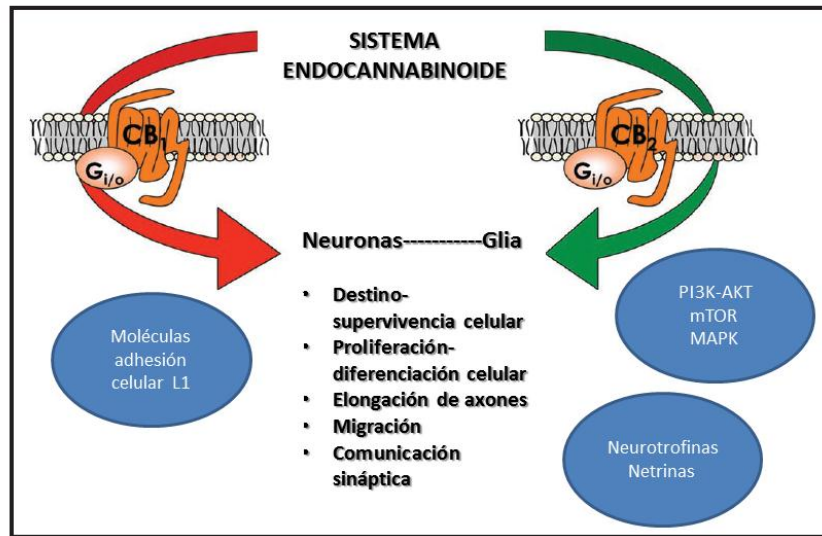
La activación del receptor CB<sub>1</sub> en un contexto de regulación a la baja de la señalización, parece clave en el proceso de elongación de neuritas. Así, se ha mostrado como los agonistas como la AEA o el WIN inhiben la formación y elongación de interneuronas que contienen GABA, aboliendo también la AEA el potencial morfogénico del BDNF (Harkany et al., 2007). Por otra parte, también se ha encontrado que la alteración en la

distribución o exceso de MGL, que podría afectar a los niveles de 2-AG, podría provocar la interrupción del proceso de crecimiento de las neuritas (Keimpema et al., 2013).

#### 4.1.3.7 Sinaptogénesis

El rol del sistema endocannabinoide en el control de la sinaptogénesis ha sido evidenciado en investigaciones que han mostrado que durante periodos críticos del desarrollo, tanto el antagonismo de receptores CB<sub>1</sub> o la sobreactivación de los mismos, puede alterar la conectividad sináptica provocando descargas epilépticas o actividad deficiente respectivamente (Bernard et al., 2005). Pero además la presencia de receptores cannabinoide en los conos de crecimiento axónico se ha relacionado con ciertos patrones de conectividad sináptica (Berghuis et al., 2007), habiéndose mostrado que la presencia de los receptores se diluye una vez se ha producido la sinaptogénesis y la selección de las dianas postsinápticas (Gomez et al., 2008). Por otra parte, la falta de receptores CB<sub>1</sub> en las interneuronas GABA del córtex, en ratones knock-out para el receptor, también altera la selección de dianas, lo cual enfatiza el rol del sistema endocannabinoide en la sinaptogénesis y en la selección de dianas postsinápticas (Berghuis et al., 2007).

En la **figura 10** se encuentran sintetizadas las acciones del sistema endocannabinoide en el desarrollo cerebral, destacándose el papel de algunos mecanismos involucrados en el proceso.



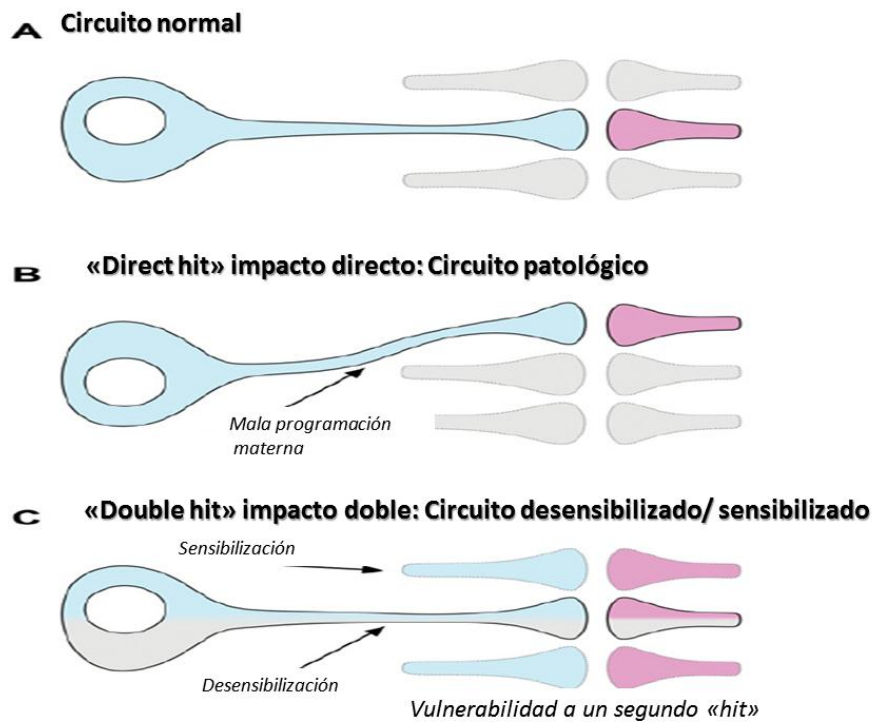
*Figura 10.* Acción de la señalización cannabinoide durante el desarrollo cerebral. Mecanismos propuestos. Modificado de Gómez et al. (2008).

#### 4.1.4 Evidencias de alteración en el sistema endocannabinoide tras la exposición perinatal a estímulos adversos

Considerando los aspectos anteriores y la información proveniente de investigación en el marco de la programación, se ha propuesto que las modificaciones en la señalización cannabinoide podrían producir alteraciones en las redes neuronales que participan tanto en los procesos cognitivos como en procesos de regulación del equilibrio energético (Keimpema et al., 2013).

De especial interés es el proceso de conectividad sináptica, que se produce durante el desarrollo cerebral. Durante este proceso los insultos maternos pueden provocar de forma directa una condición patológica, lo que se ha llamado “*direct hit*” o impacto directo. Pero también se puede producir una situación de conectividad alterada que en principio no genere síntomas, pero sí pueda provocar respuestas alteradas en los circuitos neuronales en el futuro. Estos cambios sutiles podrían producir errores en el procesamiento o enlentecimiento en el mismo, que en circunstancias de exposición a un estresor posterior

puedan ya sí propiciar la aparición de patologías, a través de un “*doble hit*” o impacto doble (Keimpema et al., 2013) (*figura 11*). Considerando el rol del sistema endocannabinoide en este proceso, se ha propuesto que cualquier desviación de este sistema en ventanas críticas podría provocar afectación del circuito, lo que resultaría en un cableado incorrecto de las redes neurales. De esta manera la actividad excesiva o deficiente, podrían conducir a déficits, como por ejemplo los déficits cognitivos, en etapas posteriores de la vida (Bernard et al., 2005).



**Figura 11.** Alteración de la conectividad sináptica por una mala programación materna. En A, los estímulos maternos y fetales se coordinan para formar un adecuado circuito cerebral. En B, la exposición intrauterina a un estímulo dañino provoca una alteración en la conexión sináptica cerebral, que conduce a un circuito patológico (“*Direct hit*”). EN C, los estímulos inadecuados durante períodos críticos pueden sensibilizar o desensibilizar las conexiones sinápticas, aumentando la vulnerabilidad a sufrir alteraciones en la etapa postnatal por la acción de nuevos estímulos (“*Double hit*”). Adaptado de Keimpema et al. (2013).

En ese sentido y de forma independiente, diferentes estudios han mostrado como la exposición perinatal al cannabis provoca cambios en el desarrollo de áreas cerebrales específicas (de Salas-Quiroga et al., 2015; Rodríguez de Fonseca, Cebeira, Fernández-Ruiz, Navarro, & Ramos, 1991) y conduce a déficits cognitivos en etapas posteriores de la vida, posiblemente asociados a cambios en la estructura sináptica y plasticidad. De esta manera,

varios trabajos han documentado, tras la exposición perinatal a derivados del cannabis o agonistas de los receptores CB<sub>1</sub>, que la descendencia puede presentar una exagerada respuesta de sobresalto, dificultades para habituarse a estímulos novedosos, hiperactividad, desatención y/o retraso cognitivo en la adolescencia (Metz & Stickrath, 2015; Huizink & Mulder, 2006; Antonelli et al., 2005). Además, los modelos animales de exposición perinatal al cannabis han demostrado que la descendencia en la etapa adulta puede presentar alteraciones en algunas conductas motoras, como el acicalado, la crianza y olfateo, modificaciones en la respuesta locomotora, el comportamiento exploratorio, la interacción social y el comportamiento sexual, además de anormalidades en las respuestas conductuales ante la presentación de estímulos novedosos de forma diferencial según el sexo (Navarro, Rubio, & de Fonseca, 1995). También la exposición perinatal al THC se ha asociado a un modificaciones en los efectos reforzadores de una dosis moderada de morfina, estando estos cambios asociados a alteraciones en la secreción de CRF (Factor liberador de corticotropina) y corticosterona de forma diferencial según el sexo, lo que apoyaría la idea de afectación del eje HPA sexo-dependiente (Rubio et al., 1998; Rubio et al., 1995). Específicamente se ha sugerido, que el THC podría aumentar la síntesis de endocannabinoides y su liberación, como es el caso de la AEA, pero también podría provocar una regulación a la baja de los receptores cannabinoides y desensibilización de los receptores (Harkany, Keimpema, Barabás, & Mulder, 2008). Por otra lado, se ha propuesto que el consumo materno de marihuana podría activar de forma mantenida los receptores cannabinoides alterando la migración, selectividad de dianas postsinápticas y diferenciación funcional de los axones en desarrollo (Berghuis et al., 2007).

En lo que se refiere a la interferencia de diferentes fármacos, también se ha mostrado como la exposición temprana a algunos de ellos interfieren en la señalización cannabinoide provocando, modificación a largo plazo, en la estructura sináptica y función (Harkany et al., 2008). Así, por ejemplo la administración de antagonistas de los receptores CB<sub>1</sub> en el periodo perinatal puede afectar a la migración, crecimiento y el cableado de axones afectando a funciones como la somatosensorial y/o motora, mientras que la administración de agonistas durante la gestación, como el WIN 55,2122, podrían aumentar la migración radial y tangencial en el córtex, provocando alteraciones en la neurotransmisión sináptica glutamatérgica, con afectación posterior del aprendizaje y memoria (Maccarrone et al., 2014; Moreno, Escuredo, Munoz, Rodriguez de Fonseca, & Navarro, 2005). Adicionalmente, se ha documentado que la exposición durante la gestación a inhibidores de

FAAH, que produce un aumento en las concentraciones de AEA, no provoca alteraciones inmediatas pero sí altera en la descendencia en la etapa adulta la preferencia por cocaína, aumenta las conductas relacionadas con la depresión y afecta a la memoria de trabajo (Wu et al., 2014). Todos aspectos destacan la importancia de una adecuada señalización cannabinoide en periodos críticos del desarrollo.

Por último, es importante resaltar que existen evidencias de que la exposición a dietas inadecuadas desde periodos críticos puede alterar la señalización cannabinoide, estando ello a su vez vinculado con el posterior desarrollo de anomalías conductuales. (Larrieu, Madore, Joffre, & Laye, 2012; Lafourcade et al., 2011;). Estos aspectos se detallan a continuación.

## **4.2 Influencia de los estímulos nutricionales en el sistema endocannabinoide**

Hasta el momento se ha considerado la importancia de los estímulos nutricionales inadecuados en momentos críticos del desarrollo y su impacto en el posterior riesgo de desarrollar patologías metabólicas o trastornos conductuales. Una cuestión interesante sería saber si las dietas durante este periodo podrían modificar la señalización cannabinoide. En ese sentido, algunas investigaciones ponen énfasis en la posible modificación del sistema endocannabinoide en función de las dietas empleadas. A continuación se revisan.

Diferentes investigaciones han sugerido que las concentraciones de endocannabinoides y N-aciletanolaminas podrían variar en función de ciertas condiciones dietéticas. Así, la privación de comida aumenta las concentraciones de 2-AG y AEA en el cerebro límbico e hipotálamo de ratas adultas, disminuyendo las concentraciones de estos endocannabinoides cuando a los animales se les permite comer (Kirkham et al., 2002). También en el intestino de ratas adultas durante el ayuno se produce una reducción de los niveles de OEA y un aumento de la AEA, sucediendo lo contrario cuando los animales rompen el ayuno (Gomez et al., 2002; Rodriguez de Fonseca et al., 2001). También, la ingesta crónica de una dieta rica en grasas se ha documentado que puede incrementar los niveles de anandamida hepática en ratones, estando este aspecto relacionado con la obesidad inducida por dieta (Osei-Hyiaman et al., 2005).

En lo que respecta a los receptores cannabinoides, algunos autores han puesto de manifiesto como ciertas condiciones dietéticas cambian la expresión y densidad de los

mismos, en especial de los receptores CB1 en el cerebro. De este modo, se han encontrado modificaciones en los receptores CB1 tras el consumo de comidas altamente palatables en el núcleo del tracto solitario (Bello et al., 2012), en el núcleo accumbens (Bello et al., 2012; Harrold et al., 2002), hipocampo (Harrold et al., 2002), en el córtex cingulado (Timofeeva, Baraboi, Poulin, & Richard, 2009) y en regiones específicas hipotalámicas (Timofeeva et al., 2009), generalmente con una regulación a la baja de los receptores (Timofeeva et al., 2009; Harrold et al., 2002) y hallándose una correlación inversa entre la densidad de los mismos receptores CB1 en hipocampo y núcleo accumbens con la ingesta de comida palatable (Harrold et al., 2002).

También se han hallado cambios en la concentración de endocannabinoides tras modificaciones en el perfil de los ácidos grasos precursores de los mismos procedentes de la dieta. La hipótesis que subyace en muchas de estas investigaciones es que las concentraciones de ácido araquidónico en los fosfolípidos, que es precursor de los dos principales endocannabinoides, dependen de la competición entre los ácidos grasos  $\omega$ -6 y los ácidos grasos  $\omega$ -3 presentes en la dieta, pudiéndose encontrar mayores concentraciones de AA cuando aumenta la ingesta de su precursor, el ácido linoleico (18:2n-6) o de su forma preformada, y siendo por tanto, menores las concentraciones cuando aumenta el perfil de ácidos grasos  $\omega$ -3, por ejemplo, a través de una mayor ingesta de ácido  $\alpha$ -linolénico, que es precursor del ácido eicopentaenoico (EPA, 20:5n-3) y del docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) o de las formas dietéticas preformadas de EPA y DHA (Alvheim et al., 2012; Lands et al., 1992). De esta manera, una deficiencia o exceso de ácido araquidónico por la ingesta de forma preformada de AA o de sus precursores, afectará a los niveles en los fosfolípidos de tejidos de ácido araquidónico modificando también a los endocannabinoides y otras NAEs (Hansen & Diep, 2009).

Considerando estos aspectos, se ha mostrado que una dieta enriquecida en ácido linoleico, aún siendo una dieta baja en grasa, puede elevar los niveles de endocannabinoides en hígado y aumentar el riesgo de desarrollar obesidad en ratones adultos (Alvheim et al., 2014). De forma interesante, estos efectos no se encuentran en el cerebro, ni están asociados a alteraciones en la conducta de la ingesta (Alvheim et al., 2014). En otro estudio desarrollado en ratas adultas expuestas a diferentes dietas ricas en grasas y enriquecidas en ácido palmítico, oleico, linoléico, araquidónico o aceite de pescado durante una semana, se ha comprobado como varían los niveles de AEA, 2-AG y OEA en cerebro, yeyuno e hígado en función de la composición de ácidos grasos de la dieta. En general, se ha

demostrado una mayor preservación de la composición de los ácidos grasos cerebrales independientemente del tipo de dieta, pero al considerar cada dieta específicamente, se han hallado diferencias. Así, la dieta enriquecida en AA aumenta los niveles de AEA en hígado y yeyuno pero no así en cerebro. También la dieta rica en ácido oleico, en comparación con la dieta rica en ácido palmítico, se asocia a mayores niveles de OEA, AEA y 2-AG en cerebro y mayores niveles de OEA en hígado. (Artmann et al., 2008). Con respecto a las N-aciletanolamidas como la PEA, se ha señalado sus niveles en tejidos son menos influenciados por los ácidos grasos de la dieta, con la excepción del intestino, que es el órgano en el que las concentraciones del ácido palmítico, su precursor, sí impactan en sus niveles (Hansen, 2013), aunque recientemente se ha demostrado en humanos cómo el perfil de ácidos grasos de la dieta puede afectar a los niveles de las NAEs incluyendo la PEA y OEA (Pu et al., 2016).

Diferentes autores han señalado que, en la etapa adulta, los endocannabinoides y, especialmente, los niveles de ácido araquidónico cerebrales son más resistentes a cambiar por el perfil de ácidos grasos de la dieta (Alvheim et al., 2014; Hansen & Artmann, 2008), sugiriéndose que el cerebro adulto debe haber un efecto meseta que permita mantener los niveles de endocannabinoides en un perfil homeostático (Wood et al., 2010). Esto podría ayudar a salvaguardar el importante y fisiológico papel que presenta el SEC en relación a la regulación sináptica, y en funciones como el movimiento, percepción sensorial, humor afectivo o neurogénesis (Di Marzo et al., 2010).

Sin embargo, parece que la afectación de los endocannabinoides cerebrales por la dieta es más fácil si se produce de forma temprana en la vida o dependiendo del tiempo de exposición o concentraciones dietéticas (Di Marzo et al., 2010). Así, en ratas Zucker una dieta enriquecida en aceite de krill desde las 4 semanas de vida es capaz de aumentar la concentración de ácido docosahexaenoico (que es un ácido graso  $\omega$ -3) en el cerebro, sin modificar los niveles de ácido araquidónico, pero sí modificando los niveles de 2-AG aunque no de AEA y otras N-aciletanolamidas (Di Marzo et al., 2010). Watanabe et al. (2003) también han mostrado cambios en los niveles de 2-AG en el cerebro tras la exposición prolongada, desde el periodo perinatal, a una dieta deficiente en ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3, sin modificación de los niveles de AA (Watanabe, Doshi, & Hamazaki, 2003). Además, tras la exposición a una dieta restringida durante 12 días, se ha documentado una disminución en los niveles cerebrales de 2-AG en ratones jóvenes, siendo en la reducción en el hipotálamo dependiente de la severidad de la restricción



(Hanus et al., 2003).

Tras la manipulación dietética durante el periodo perinatal se han hallado cambios a nivel cerebral en los niveles de endocannabinoides en la descendencia. De esta manera, se ha comprobado que la ingesta de leche deficiente en ácido araquidónico y ácido docohexaenoico disminuye los niveles de anandamida y otras NAEs, en regiones específicas del cerebro de crías de cerdo, durante el periodo neonatal, ocurriendo lo contrario cuando la leche está suplementada con ambos ácidos grasos y se miden las concentraciones en la totalidad del cerebro (Berger et al., 2001). También la subnutrición materna durante la gestación y/o lactancia hace que las crías presenten menor peso al destete, estando este aspecto asociado a menores niveles de anandamida en hipotálamo (Matias et al., 2003). Por otra parte, se ha documentado que la composición en ácidos grasos de la dieta materna provoca cambios en los niveles de endocannabinoides en el hipotálamo neonatal y también en el hipocampo, encontrándose menores niveles de AA tras la exposición perinatal a una dieta rica en  $\omega$ -3 (D'Asti, Long, Tremblay-Mercier, Grajzer, Cunnane, Di Marzo, & Walker, 2010). En relación a la calidad de los ácidos grasos, se ha comprobado que el consumo materno de dieta rica en ácidos grasos trans se asocia a menores niveles de AA y de otros ácidos grasos poliinsaturados en el momento del destete (Albuquerque et al., 2006).

Existen evidencias que vinculan la exposición crónica a dietas inadecuadas desde el periodo perinatal con alteración del sistema endocannabinoide en etapas posteriores de la vida. Así, en un estudio realizado en ratones que habían estado expuestos a dietas con contenido graso medio y alto enriquecidas en ácido linoléico desde el periodo perinatal hasta la 12 semana PN, se encontraron elevados niveles de ácido araquidónico, AEA y 2-AG en hígado y eritrocitos en la etapa adulta, siendo el efecto en cerebro menos intenso y limitado al AA. Estos aspectos fueron a su vez asociados a mayor adiposidad e ingesta en los animales (Alvheim et al., 2012). Además, la exposición crónica a una dieta deficiente de este tipo de ácidos grasos desde el periodo perinatal, provoca alteraciones en la plasticidad sináptica en la corteza prefrontal y núcleo accumbens, con desensibilización de los receptores cannabinoides de la corteza prefrontal, estando estos aspectos asociados a conductas relacionadas con la depresión, ansiedad y afectación del comportamiento social (Lafourcade et al., 2011). Similarmente, la exposición a una dieta deficiente en  $\omega$ 3 durante toda la vida, ha mostrado que puede modificar la señalización cannabinoide junto con afectación de las conductas anteriores (Larrieu et al., 2012). Pese a las evidencias de estos

estudios, queda pendiente de esclarecer el impacto que puede tener la exposición a una dieta inadecuada exclusivamente durante periodos críticos del desarrollo, en el desarrollo de alteraciones conductuales y metabólicas asociadas a alteraciones en la señalización endocannabinoide.

### **4.3 Papel del sistema endocannabinoide en la génesis de obesidad y síndrome metabólico**

En apartados previos se han detallado numerosos estudios que vinculan las condiciones nutricionales con el desarrollo de síndrome metabólico y obesidad en la edad adulta. Aunque la investigación que vincula la dieta materna inadecuada con la alteración del sistema endocannabinoide es muy limitada, resulta muy destacable el hecho de que el sistema endocannabinoide presente un papel importante en estas patologías metabólicas.

Como ya se comentaba anteriormente, existe gran evidencia sobre la sobreactivación del sistema endocannabinoide y el desequilibrio energético en situaciones como la obesidad e hiperglucemia. Así, cuando hay una sobreactivación de los receptores CB<sub>1</sub>, hay una disminución de la sensibilidad a la insulina en el hígado y el músculo esquelético, lo que incrementa inicialmente la producción de insulina. Este hecho se continúa con menor acción de la misma, lo que al final termina provocando alteración en células  $\beta$ , con el consiguiente riesgo de diabetes tipo 2. Estos efectos estarían en parte mediados por procesos inflamatorios, en los cuales se hallarían involucrados los receptores CB<sub>1</sub> del tejido adiposo y páncreas (Cristino et al., 2014).

Pero además, la hiperactivación del sistema endocannabinoide en los tejidos que controlan el equilibrio energético podría ser causada por un aumento en la disponibilidad de ácidos grasos poliinsaturados precursores de la biosíntesis de endocannabinoides, como ha sido comentado previamente y ello podría ser sostenido por la resistencia a la leptina que suele producirse en la obesidad (Di Marzo & Matias, 2005). Igualmente se ha sugerido, que la activación de los receptores CB<sub>1</sub> que se produce en la obesidad, podría favorecer la formación de tejido adiposo visceral, contribuyendo así a la inflamación y resistencia a la insulina (Cristino et al., 2014). También la hiperactivación de este sistema podría contribuir a la hiperfagia, acumulación grasa y dislipemia, ya de por sí presente en sujetos obesos (Di Marzo & Matias, 2005).

En lo que se refiere a la sobreactivación del sistema endocannabinoide en estas patologías, la misma ha podido ser demostrada en numerosas investigaciones. Así, se ha encontrado que las ratas obesas presentan mayor cantidad de receptores cannabinoides en el tejido adiposo, además de mostrar más adipocitos diferenciados que las ratas delgadas (Bensaid et al., 2003). El papel de los receptores CB<sub>1</sub> en el desarrollo de obesidad ha sido puesto en evidencia en investigaciones que han empleado los ratones knock-out para este tipo de receptor. De esta manera, se ha comprobado como los ratones sin el receptor alimentados con dieta estándar, presentar menor peso y adiposidad que los ratones que sí tienen el receptor. Cuando son expuestos a dieta rica en grasa no llegan a desarrollar obesidad ni tampoco resistencia a la insulina, como sí ocurre en los ratones con el receptor (Ravinet Trillou, Delgorge, Menet, Arnone, & Soubrie, 2004). En lo que respecta a los niveles de endocannabinoides, se ha comentado que los humanos obesos presentan mayores valores de endocannabinoides en sangre que los no obesos (Cote et al., 2007; Monteleone et al., 2005), siendo esto especialmente importante en los obesos con mayor adiposidad abdominal (Cote et al., 2007). Adicionalmente, se ha sugerido que el exceso de anandamida a nivel hepático podría contribuir a la obesidad inducida por dieta (Osei-Hyiaman et al., 2005).

De todo ello, puede considerarse que el sistema endocannabinoide tiene un importante rol en lo que respecta al desarrollo y mantenimiento de la obesidad y el síndrome metabólico. De este modo, los pacientes obesos presentan una ingesta excesiva, especialmente de dulces y comidas palatables, y ello puede producir una sobreactivación del sistema, resultando en alteraciones típicas del síndrome metabólico (Tibirica, 2010) (*figura 12*).

En lo que respecta a la investigaciones realizadas en el periodo perinatal, se ha mostrado que los animales tratados con una solución de anandamida durante la lactancia, desarrollan mayor peso, ingesta y adiposidad en la edad adulta, estando además estos aspectos asociados a un incremento en la expresión de receptores CB<sub>1</sub> en la grasa (Aguirre, Castillo, & Llanos, 2012). Todo ello apunta a que la exposición a una dieta inadecuada y/o a niveles de endocannabinoides alterados, durante periodos críticos del desarrollo, podría programar el riesgo de desarrollar patologías metabólicas más tarde en la vida.

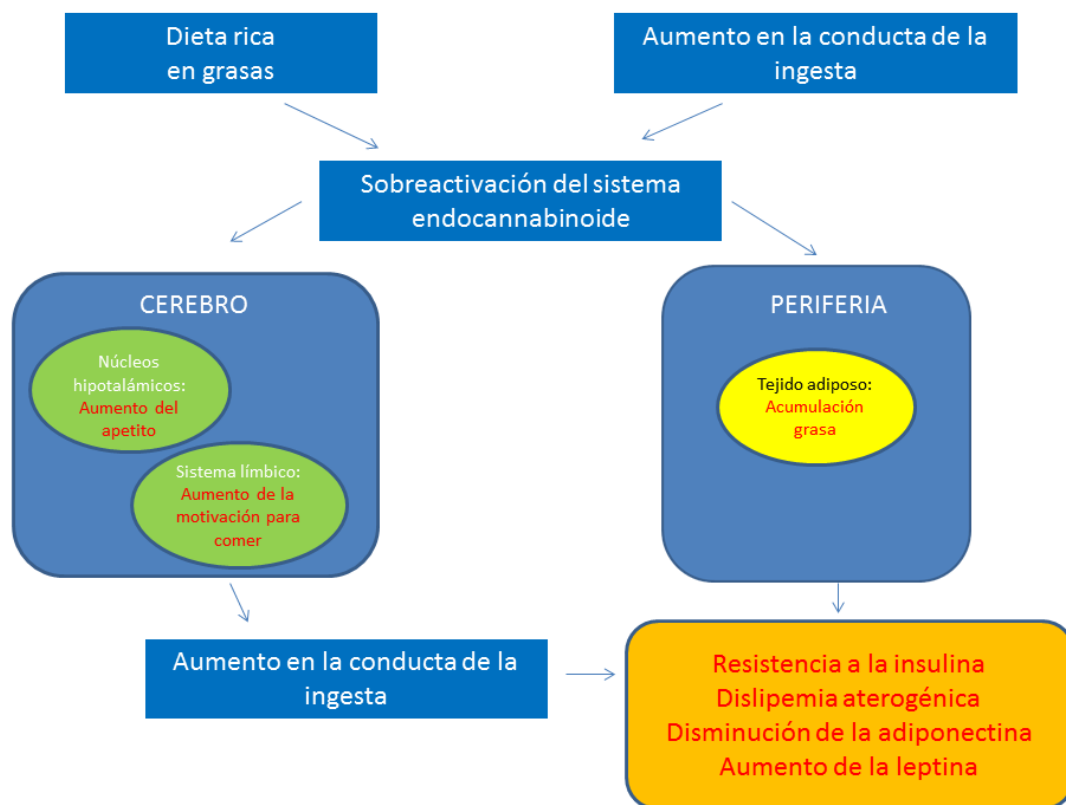


Figura 12. Implicación del sistema endocannabinoide en la patofisiología del síndrome metabólico. Adaptado de Tibirica (2010).

#### 4.4 Relación del sistema endocannabinoide con los trastornos neuropsiquiátricos y alteraciones conductuales

La exposición perinatal al cannabis o la administración de agonistas cannabinoides en periodos críticos del desarrollo puede conducir a alteraciones conductuales en la descendencia (Antonelli et al., 2005; Moreno et al., 2005; Rubio et al., 1998; Navarro et al., 1995; Rubio et al., 1995). Dentro de las anomalías conductuales ocupan un papel importante la afectación de las respuestas emocionales, lo que apoyaría la idea de que la alteración de la señalización cannabinoide podría afectar la formación de circuitos implicados en la modulación emocional. Este aspecto no resulta sorprendente considerando que el sistema endocannabinoide ha sido considerado como un sistema regulatorio cerebral que ayuda a modular las respuestas emocionales, y está involucrado en conductas y /o trastornos como la ansiedad, el miedo, el estrés y la depresión (Lutz, 2009;

Lutz, Marsicano, Maldonado, & Hillard, 2015).

Específicamente, los receptores cannabinoides se expresan en áreas implicadas en la regulación emocional, modulando la liberación de neurotransmisores que juegan un importante papel en el control de las emociones, entre los que destacan la dopamina, serotonina, pero también regulan la liberación de neuropéptidos ansiogénicos como son la CCK (colecistoquinina) o el CRF (Factor liberador de corticotropina) (Trezza et al., 2012).

En relación a las respuestas de ansiedad, se ha demostrado que tanto el bloqueo de la FAAH (enzima degradadora de AEA), a dosis bajas, o el aumento ligero en los niveles de AEA, resultan en un efecto ansiolítico (Rubino et al., 2008). Por otra parte, se ha señalado que el bloqueo de receptores cannabinoides, así como la falta de activación de los receptores CB<sub>1</sub> y la activación del receptor vaniloide TRPV<sub>1</sub>, por concentraciones extremas de AEA, producen ansiedad (Lutz, 2009; Rubino et al., 2008). También en animales con ausencia de la enzima diacilglicerol lipasa (DGL), que a su vez muestran niveles de los principales endocannabinoides reducidos (2-AG y AEA), se encuentran aumentadas las respuestas de ansiedad, estrés y miedo, junto con menor neurogénesis hipocampal (Jenniches et al., 2015).

El efecto ansiogénico del bloqueo endocannabinoide ha sido también constatado en humanos. Así, el tratamiento con rimonabant, a dosis que bloquean los receptores en un 40-60%, producía efectos beneficiosos metabólicos en pacientes obesos pero sin embargo, también aumentaba el riesgo de desarrollar trastornos psiquiátricos como la depresión y ansiedad (Lutz, 2009). Este hecho hizo que el fármaco fuera retirado del mercado por las autoridades europeas en 2009 (European Medicines Agency (EMA), 2009).

Por otra parte, parece que el sistema endocannabinoide está implicado en la extinción de memorias aversivas, pero no en la adquisición o consolidación de memorias de miedo. (Lutz, 2009), lo cual enfatiza su papel en alteraciones conductuales como la fobia, la ansiedad generalizada o trastorno de estrés postraumático. En estos trastornos podría haber un mal procesamiento de la memoria junto con dificultades de adaptación a las condiciones ambientales (Lutz, 2007). Específicamente, el SEC estaría más implicado en los componentes no asociativos de la extinción de memoria del miedo, relacionadas con procesos de habituación (Kamprath et al., 2006).

Además, el SEC parece jugar un importante papel en el alivio del estrés, estando implicado

en la regulación del eje HPA. De esta manera, se ha encontrado que al inducir estrés, la liberación de corticosterona es mucho más potente con el bloqueo de los receptores cannabinoideos (Steiner & Wotjak, 2008). También el SEC podría estar involucrado en la respuesta de habituación al estrés crónico y homotípico, como constantan los cambios en la señalización endocannabinoide tras la exposición a estímulos estresantes (Patel & Hillard, 2008). Estos aspectos resultan de gran importancia para el desarrollo de los trastornos de ansiedad y depresivos.

En relación a los trastornos depresivos, existen evidencias de la vinculación del sistema endocannabinoide con su desarrollo, encontrándose por ejemplo que los inhibidores de la FAAH, así como los agonistas de los receptores cannabinoideos, pueden aumentar los niveles de serotonina y noradrenalina (Bambico & Gobbi, 2008), de una forma similar a como lo hacen los antidepresivos. También en modelos animales de depresión, se ha encontrado modificación en la expresión de cannabinoideos en áreas corticales y subcorticales, algunas de las cuales pueden ser revertidas por fármacos antidepresivos (Hill et al., 2008). Específicamente en humanos, se ha encontrado que la presencia de un polimorfismo para el gen del receptor cannabinoide, específicamente el SPN rs1049353 con GG alelos, correlaciona con un mayor resistencia al tratamiento antidepresivo, estando a su vez este aspecto asociado a comorbilidad con trastornos de ansiedad y con menor respuesta en áreas subcorticales talámicas, de los ganglios basales y del sistema límbico ante la presencia de caras felices (Domschke et al., 2008). En cambio, el polimorfismo de nucleotido simple (SNP) del receptor cannabinoide (SNP rs1049353 en los alelos AA) correlaciona positivamente con el aumento de la respuesta del estriado ante las caras felices, lo que sugiere que el sistema endocannabinoide, y específicamente el genotipo de los receptores cannabinoideos, podría tener un papel importante al modular la recompensa social y ello podría tener implicaciones en trastornos como la depresión o el autismo (Chakrabarti, Kent, Suckling, Bullmore, & Baron-Cohen, 2006).

Por otra parte, el consumo de marihuana en periodos críticos del desarrollo neural tiene consecuencias permanentes a nivel cognitivo y emocional como ya se apuntaba anteriormente, habiéndose documentado en diferentes estudios un incremento en el riesgo de desarrollar psicosis en sujetos adolescentes que consumen marihuana (Chadwick, Miller, & Hurd, 2013; Trezza et al., 2012; Lutz, 2009; Huizink & Mulder, 2006).

En relación con la dieta pocos estudios han indagado en cómo las condiciones dietéticas

maternas podrían influir en el desarrollo de alteraciones conductuales en etapas posteriores de la vida. En relación con una dieta deficiente en ácidos grasos  $\omega$ -3 durante periodos críticos del desarrollo, se ha comprobado que la exposición a la misma provoca una excesiva respuesta en el eje HPA ante el estrés y aumenta los índices de depresión y ansiedad en etapas posteriores de la vida, estando estos aspectos además asociados a menor plasticidad neuronal (Chen & Su, 2013; Bhatia et al., 2011). Aunque no específicamente estudiado ese período, sí se ha comprobado cómo la exposición crónica de este tipo de dieta desde el periodo perinatal, además de vincularse a conductas ansiosas y depresivas y alteraciones en la plasticidad sináptica en la etapa adulta, se asocia a alteraciones en la señalización cannabinoide, tales como alteración en el bloqueo de la depresión a largo plazo mediada por endocannabinoides, en corteza prefrontal y accumbens, desensibilización de los receptores o alteraciones en la cascada MAPK (Larrieu et al., 2012; Lafourcade et al., 2011). De todo ello, parece lógico pensar que una dieta materna inadecuada podría alterar la señalización cannabinoide desde etapas precoces aumentando el riesgo de desarrollar alteraciones conductuales en etapas posteriores.

## 4.5 Conclusiones

Recientemente se ha propuesto que la nutrición materna podía alterar la señalización cannabinoide y que este sistema podría actuar como un sustrato molecular de la programación (Keimpema et al., 2013). Sin embargo, existe gran escasez de estudios que contemplen esta hipótesis, por lo que se requiere de más investigación para clarificar el rol del sistema endocannabinoide en estos procesos.

Teniendo en consideración los apartados anteriores, el estudio de la implicación del sistema endocannabinoide en la programación metabólica y conductual resulta muy pertinente, dada la relación que el sistema endocannabinoide tiene con otros mecanismos previamente estudiados y también con las patologías metabólicas y neuropsiquiátricas a las que se asocia una mala programación. Por una parte, los niveles de endocannabinoides fetales o neonatales, podrían fácilmente estar influidos por la dieta materna, pudiendo a su vez afectar al desarrollo de la normal gestación y el desarrollo cerebral. También, la afectación de circuitos cerebrales implicados en la regulación emocional y metabolismo podría dar cuenta de alteraciones metabólicas y conductuales observadas en etapas posteriores de la vida. Por todo ello, se hace necesario investigar las posibles relaciones de este sistema con

la programación metabólica y conductual.



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En los últimos años se está generando abundante información sobre los efectos de las dietas maternas inadecuadas en momentos críticos del desarrollo. En un intento de explicar las alteraciones metabólicas y conductuales observadas en la descendencia en etapas posteriores de la vida, se ha estudiado el papel de diferentes mecanismos biológicos. Sin embargo, poca ha sido la investigación realizada en este campo sobre el sistema endocannabinoide, el cual está implicado en muchas de patologías asociadas a una mala programación y presenta además un importante rol en el desarrollo de circuitos neurales implicados en metabolismo y diversas conductas.

Considerando estos aspectos la **principal hipótesis** que se ha planteado en esta investigación es:

*“El sistema endocannabinoide está involucrado en el proceso de programación metabólica y conductual que se produce durante el período perinatal”*

Como hipótesis específicas se plantean:

**H1:** La exposición perinatal a diferentes dietas (dieta hipocalórica o dieta hipercalórica rica en grasas y azúcares, altamente palatable) puede alterar la señalización cannabinoide en etapas tempranas.

**H2:** La alteración de la señalización cannabinoide en etapas tempranas puede afectar al desarrollo de circuitos implicados en el metabolismo y regulación emocional, incrementando así el riesgo de desarrollar alteraciones metabólicas y conductuales en el futuro.

**H3:** Los efectos a largo plazo metabólicos y conductuales, provocados por la exposición a dietas maternas inadecuadas, están mediados por alteraciones en la expresión de ciertos componentes del sistema endocannabinoide y/o genes relacionados.

Para corroborar estas hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

El **objetivo general** es estudiar el estado del sistema endocannabinoide en animales sometidos a una dieta restringida y/o hipercalórica altamente palatable durante el periodo perinatal y que posteriormente presenten alteraciones metabólicas y/o conductuales. Para ello se comprobará específicamente si hay alteraciones en algunos componentes del sistema endocannabinoide desde etapas precoces y si las mismas se asocian con anomalías en el sistema endocannabinoide posteriormente.

Para ello se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

- 1. Evaluación el efecto diferencial de la dieta materna en la gestación y sus productos.** Específicamente evaluando el efecto de la dieta materna restringida o hipercalórica y altamente palatable, implementadas desde el periodo preconcepcional, en las madres y en sus crías. Concretamente se estudiarán parámetros de fertilidad, ganancia de peso corporal, ingesta calórica y adiposidad en las madres y en las crías se evaluarán parámetros antropométricos y mortalidad. Adicionalmente se evaluarán los efectos maternos y neonatales de una dieta restringida implementada únicamente durante la gestación, con el fin de poder establecer comparaciones con los resultados obtenidos en la restricción aplicada desde el periodo preconcepcional.
- 2. Evaluar el efecto de la dieta materna (restringida e hipercalórica), implementada desde el periodo preconcepcional, en parámetros de crecimiento y relacionados con el estado metabólico de la descendencia,** y para ello se monitorizará la ganancia ponderal, ingesta calórica a lo largo del ciclo vital, así como la adiposidad en la etapa adulta. Además, al final del estudio se evaluarán metabolitos plasmáticos así como la leptinemia y la expresión del ARNm de genes implicados en el metabolismo en el hígado y la grasa perirrenal.
- 3. Evaluación del papel de la dieta materna (restringida e hipercalórica), implementada desde el periodo preconcepcional, en la aparición de conductas alteradas en la descendencia.** Concretamente las conductas a estudiar son las conductas relacionadas con la ansiedad y la conducta

locomotora. También se evaluará la conducta de la ingesta junto con las preferencias por comidas, así como la respuesta en la conducta de la ingesta tras la administración de un antagonista de los receptores cannabinoides.

4. **Evaluación del estado del sistema endocannabinoide en la descendencia sometida a diferentes dietas maternas en diferentes momentos del ciclo vital.** Específicamente, a través de la medición de niveles de endocannabinoides al nacimiento en tejidos cerebrales involucrados en metabolismo y control emocional (hipotálamo, hipocampo y bulbo olfatorio) en las crías macho sometidas a las dietas maternas inadecuadas implementadas desde el periodo preconcepcional y en las crías macho y hembra en los animales únicamente expuestos a dietas maternas inadecuadas durante la gestación. También, en el caso de las dietas maternas inadecuadas aplicadas desde el periodo preconcepcional, se evaluará el estado del sistema endocannabinoide en la etapa adulta, a través de la cuantificación de la expresión de genes de componentes del sistema endocannabinoide en tejidos claves para la regulación del metabolismo (hipotálamo, hígado y grasa perirrenal).
5. **Evaluar la presencia de dimorfismo sexual en la descendencia sometida a diferentes dietas maternas,** analizando para ello las diferencias entre machos y hembras en los parámetros metabólicos y conductuales evaluados en los objetivos previos.

Con todo ello se pretende contribuir a una mayor clarificación de los mecanismos que favorecen el desarrollo de las patologías metabólicas y/o alteraciones conductuales que tienen su origen en etapas tempranas del desarrollo. Mejorar la comprensión de los procesos que subyacen a una mala programación, puede resultar una acertada estrategia en la búsqueda de medidas terapéuticas, psicológicas y farmacológicas eficaces contra dichas alteraciones.

Las conclusiones, aunque tienen la limitación de no poder ser directamente extrapolables a la población humana, podrían ayudar a poner en valor el papel de las actividades de prevención primaria durante los periodos críticos del desarrollo, que incluyan el periodo pregestacional, gestacional, lactante e incluso la infancia temprana.



## MATERIAL Y MÉTODOS

En el apartado de material y métodos de los artículos que componen esta tesis se detallan los test, técnicas y procedimientos empleados para medir las variables dependientes de la presente investigación. Por tanto, con el fin de facilitar su comprensión y evitar redundancias, en este apartado se especificará el diseño experimental general, detallando los modelos implementados en este estudio para estudiar los efectos de las dietas maternas restringidas e hipercalóricas, enfatizando sus diferencias.



# 1 DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL

En la presente investigación se empleó un diseño de tipo experimental y longitudinal en un total de 237 ratas de la cepa Wistar (46 madres y 191 crías), con el fin de determinar los efectos de la dieta materna restringida y de la dieta materna hipercalórica en las madres y su descendencia. Para ello se emplearon tres modelos animales, que se diferenciaban en el tipo de dieta materna empleada, momento en que la misma se implementaba o en el seguimiento que se hacía posteriormente a la descendencia. Se detallan a continuación:

## 1.1 Evaluación del efecto de la dieta materna restringida implementada durante el periodo perinatal

Para poder evaluar los efectos de la dieta materna restringida se emplearon dos modelos animales distintos, que diferían en el momento en que se aplicaba la restricción calórica a las madres y el seguimiento que se hacía posteriormente a la descendencia. En ambos casos las madres fueron asignadas a una dieta de restricción calórica al 20%, que fue una dieta de restricción moderada. Para ello se presentaba a diario el 80 % de la ingesta calórica relativa al peso corporal del grupo control correspondiente.

### 1.1.1 Modelo de restricción calórica materna tipo 1 (R1): Restricción calórica preconcepcional y gestacional

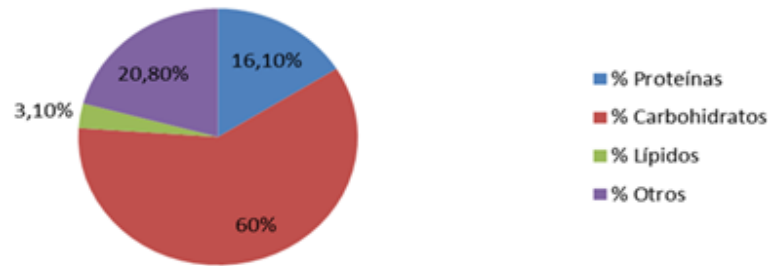
En este modelo las madres fueron asignadas a una dieta control (n=9) (dieta estándar que proporcionaba 16.1% proteínas, 60% carbohidratos, 3.1% grasas, 4% fibra, 0.0025% de sodio y 2.9 Kcal/g (**figura 13**)) o una dieta restringida al 20% (n=15), desde dos semanas previas al apareamiento hasta el día 20 de la gestación, momento en que finalizaba la restricción calórica. Al nacimiento (día PN 0) se evaluó el tamaño de la camada y el peso de cada cría. Los animales fueron sexados y las camadas se ajustaron a cuatro hembras y cuatro machos en la medida de lo posible. Los animales restantes fueron sacrificados por decapitación rápida. En parte de las crías macho sacrificadas, los cerebros fueron diseccionados para medir endocannabinoides y lípidos relacionados (anandamida (AEA), 2-araquidonilglicerol (2-AG, ácido araquidónico (AA), oleiletanolamida (OEA) y palmitoiletanolamida (PEA)) en hipotálamo, hipocampo y bulbo olfatorio (Grupo control

n=7; Grupo R1 n=14), a través de espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC/MS). Al destete (día 22-23 postnatal) las madres fueron sacrificadas y se empezó a hacer un seguimiento de la descendencia macho y hembra hasta la etapa adulta (5° mes postnatal) (Grupo control (CC) n=15-18; Grupo R1 (RC) n=23-23, para machos y hembras respectivamente).

En las madres, durante el periodo perinatal se monitorizó la ganancia ponderal, la ingesta calórica, y durante el periodo preconcepcional también se evaluó el ciclo estral. Al destete, se evaluó la adiposidad. En el caso de la descendencia de ambos sexos se monitorizó durante todo el periodo de estudio la variación en el peso corporal. Después del destete, que fue realizado con una dieta estándar, se evaluó además la ingesta calórica. Durante los periodos adolescente y adulto se realizaron los test conductuales (laberinto en cruz elevado; test de campo abierto ("*open field test*"); test de ingesta compulsiva, evaluación de la conducta de la ingesta tras la administración de AM251), dirigidos a evaluar las conductas relacionadas con la ansiedad, la respuesta locomotora, conducta de la ingesta y preferencias por comidas. Al sacrificio, en la etapa adulta (5° mes postnatal), se evaluaron la adiposidad abdominal y los metabolitos plasmáticos (leptina, glucemia, triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL, VLDL, Urea, Bilirrubina, ALKP;  $\gamma$ GT, AST, ALT y AST/ALT). También se midió por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) a tiempo real, la expresión de genes del sistema endocannabinoide (*Cnr1*, *Cnr2*, *Napepld*, *Faah*, *Dalga*, *Dagl $\beta$* , *Mgl1*) en el hipotálamo, hígado y grasa. Además, se evaluó la expresión génica de genes reguladores de la lipogénesis (*Chrebp*, *Acaca*, *Fasn*, *Scd1*), de la  $\beta$ -oxidación (*Cpt1a/b*, *Acox1*), del metabolismo del colesterol (*Srebf1/2*, *Insig1/2*, *Hmgcr*), de la termogénesis/respiración mitocondrial (*UCp1*, *Cox11*) y genes reguladores del almacenamiento y metabolismo lipídico (*Ppara*, *Ppar $\gamma$* ) en el hígado y en la grasa perirrenal.



### Composición nutricional: Dieta estándar (2.9 Kcal/g)



*Figura 13.* Características nutricionales de la dieta estándar empleada en este estudio

#### 1.1.2 Modelo de restricción calórica tipo 2 (R2): Restricción calórica gestacional

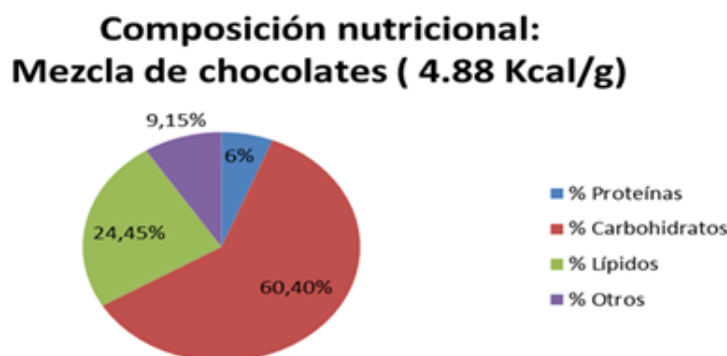
En este modelo se estudió el efecto de la dieta materna restringida al 20% (n=7), en comparación con sus respectivos controles (n=4) (asignados a una dieta estándar, que proporcionaba 16.1% proteínas, 60% carbohidratos, 3.1% grasas, 4% fibra, 0.0025% de sodio y 2.9 Kcal/g (*figura 13*)), durante toda la gestación hasta el nacimiento de las crías. A diferencia del modelo R1, la restricción se inició el día posterior al apareamiento (día de la gestación 0), y por tanto no incluyó el periodo pregestacional. Además, la restricción calórica materna continuó hasta el día del parto (día PN 0). En las madres, durante el periodo gestacional se monitorizó la ganancia ponderal y la ingesta calórica. En el momento del nacimiento se evaluó el tamaño de la camada y el peso de cada cría. Los animales fueron sacrificados por decapitación rápida. En parte de las crías macho y hembras sacrificadas, los cerebros fueron diseccionados para medir endocannabinoides y lípidos relacionados (AEA, 2-AG, AA, OEA, PEA) en hipotálamo, hipocampo y bulbo olfatorio (Grupo control n=14-10; Grupo R2 n=18-10, respectivamente para machos y hembras). El seguimiento de la descendencia en este modelo finalizó, por tanto, el día del nacimiento.

## 1.2 Evaluación del efecto de la dieta hipercalórica implementada durante el periodo perinatal

Para evaluar los efectos de una dieta hipercalórica se implementó un único modelo:

### 1.2.1 Modelo de dieta materna hipercalórica/altamente palatable (P)

En este modelo las madres fueron asignadas desde ocho semanas previas al apareamiento hasta el final de la lactancia a una dieta control (n=9) (dieta estándar que proporcionaba 16.1% proteínas, 60% carbohidratos, 3.1% grasas, 4% fibra, 0.0025% de sodio y 2.9 Kcal/g (*figura 13*)) o una dieta de libre elección entre la dieta estándar y una dieta hipercalórica/altamente palatable (n=11), compuesta por una mezcla de chocolates, que proporcionaba 6% de proteínas, 60.4% de carbohidratos (de los cuales el 89% eran azúcares simples), 24.45% de grasas (de las cuales el 56.2% eran grasas saturadas), .45% de fibra, 0.17% de sodio y 4.88 Kcal/g (*figura 14, 15*)

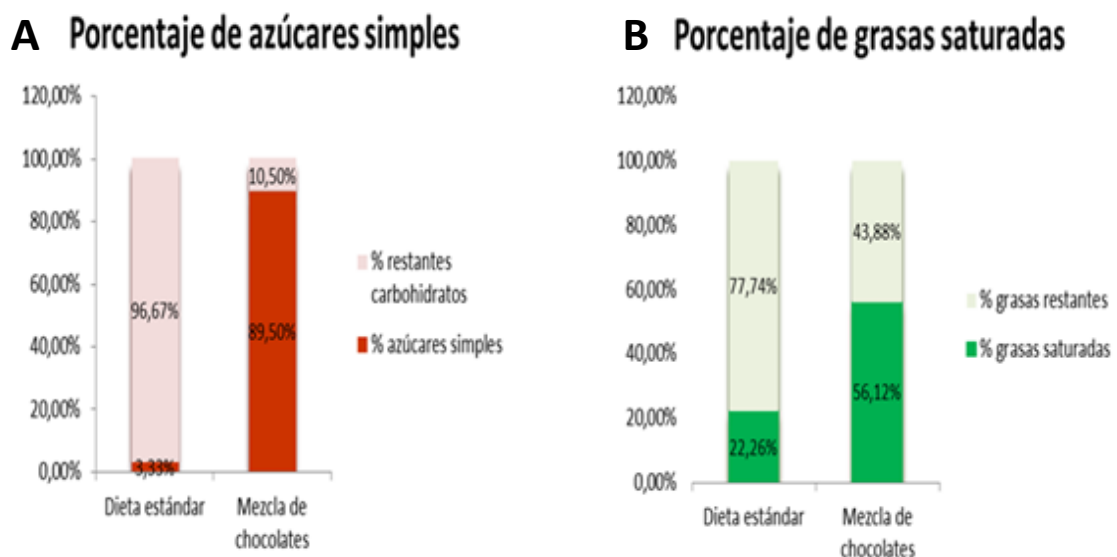


*Figura 14.* Características nutricionales de la mezcla de chocolates comerciales empleada en este estudio

En el momento del nacimiento se evaluó el tamaño de la camada y el peso de cada cría, observándose además la presencia de bandas de leche en las crías de ambas condiciones perinatales. Los animales fueron sexados y las camadas se ajustaron a cuatro hembras y cuatro machos en la medida de lo posible. Los animales restantes fueron sacrificados por decapitación rápida. En las crías macho sacrificadas, los cerebros fueron diseccionados para medir endocannabinoides y lípidos relacionados (AEA, 2-AG, AA, OEA, PEA) en hipotálamo, hipocampo y bulbo olfatorio (Grupo control n=7; Grupo P n=13). Al destete (día 22-23 postnatal), las madres fueron sacrificadas y se empezó a hacer un seguimiento de

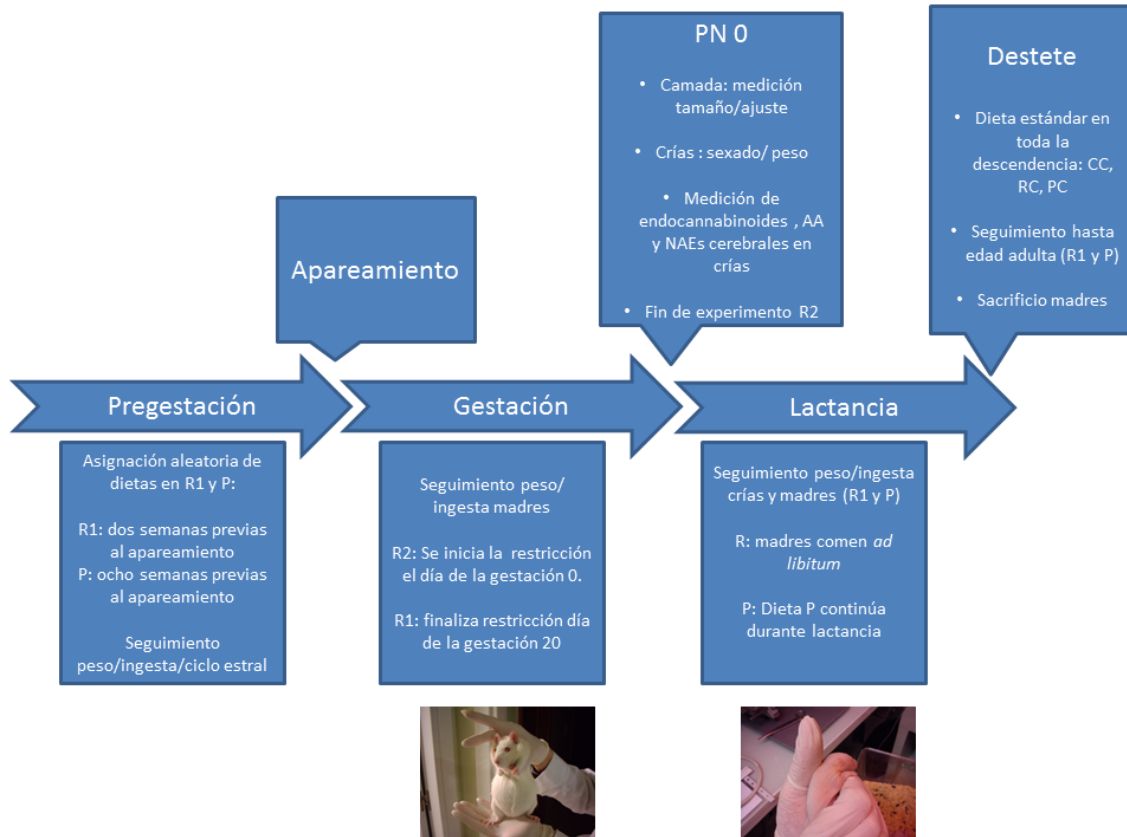
la descendencia macho y hembra hasta la etapa adulta (5° mes postnatal) (Grupo control (CC) n=15-18; Grupo P (PC) n=17-23, para machos y hembras respectivamente).

En las madres, durante el periodo perinatal al igual que en el modelo R1, se monitorizó la ganancia ponderal, la ingesta calórica, y el ciclo estral, durante dos semanas previas al apareamiento, observándose además la evolución en la preferencia por el chocolate durante el periodo perinatal. Al destete, se evaluó la adiposidad. En el caso de la descendencia de ambos sexos se siguió el mismo protocolo que en el modelo R1 para evaluar los parámetros de crecimiento, metabólicos, conductuales y la expresión génica del sistema endocannabinoide. En el hígado y grasa perirrenal, se evaluó también la expresión génica de los genes implicados en lipogénesis (*Acaca*, *Scd1*), de la  $\beta$ -oxidación (*Cpt1a/b*) y genes reguladores del almacenamiento y metabolismo lipídico (*Ppara*, *Ppar $\gamma$* ).

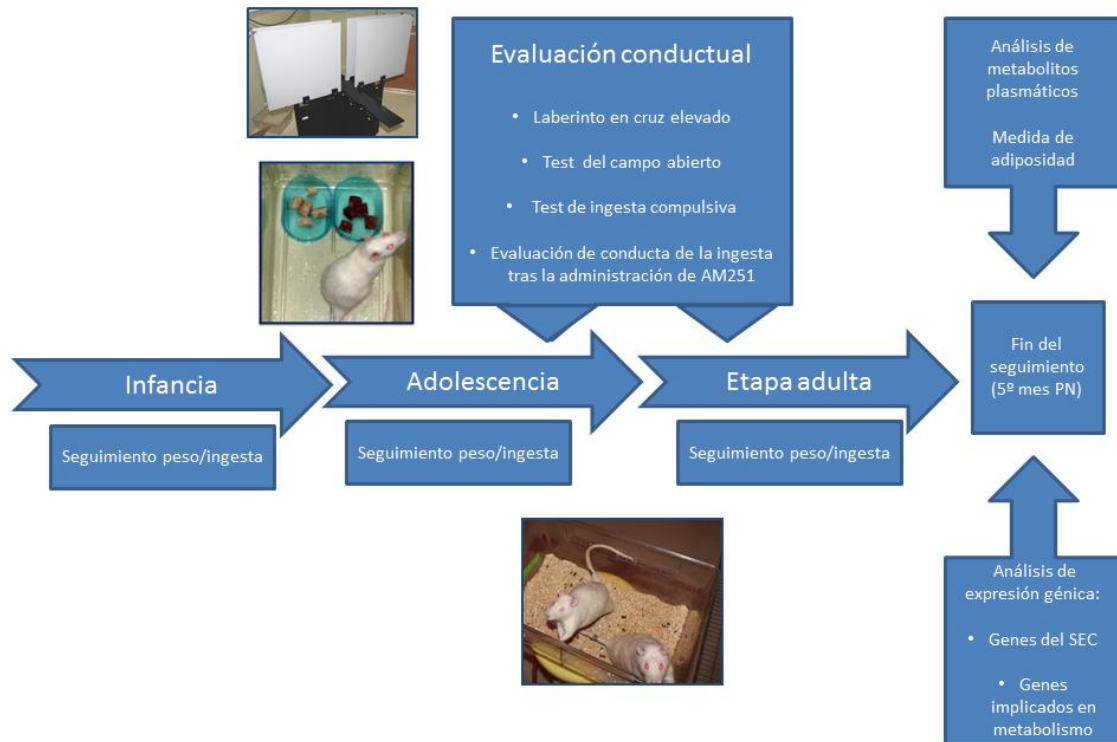


**Figura 15.** Porcentaje de azúcares simples (A) y grasas saturadas (B) de las dietas empleadas en el estudio

En **las figuras 16** y **17** se encuentran sintetizado el protocolo experimental llevado a cabo durante el periodo perinatal y postdestete, respectivamente.



**Figura 16.** Implementación de las dietas maternas en los tres modelos estudiados durante el periodo perinatal (pregestación, gestación y lactancia). Las dietas experimentales se iniciaron durante el periodo preconcepcional en los modelos R1 y P y finalizaron el día 20 de la gestación, en el modelo R1 y al final de la lactancia en el modelo. En el modelo R2 empezó la restricción calórica el día posterior al apareamiento y continuó hasta el día del parto. El seguimiento de la descendencia finalizó el día del parto en el modelo R2 y continuó hasta la etapa adulta en los modelos R1 y P. Al nacimiento en todos los modelos se evaluaron los niveles de endocannabinoides cerebrales.



*Figura 17.* Seguimiento de la descendencia tras el destete. En los modelos R1 y P se realizó un seguimiento de la descendencia hasta la etapa adulta evaluándose a lo largo del periodo de estudio parámetros metabólicos y conductuales. Al final del estudio (5º mes postnatal) se analizó la expresión génica de componentes del sistema endocannabinoide y otros genes implicados en el metabolismo.



## RESULTADOS

En este apartado se evaluarán los efectos diferenciales de la dieta materna restringida y de la dieta materna hipercalórica/altamente palatable en las madres y en su descendencia. Los resultados se han organizado de acuerdo a los artículos publicados (**artículos 2, 3, 5, 4 y 6**) que evalúan por separado el efecto de la exposición a las diferentes dietas perinatales en el sistema endocannabinoide, tanto en las crías al nacimiento como en la descendencia adulta. Los datos relacionados, que no han sido incluidos en los manuscritos científicos, pero que resultan importantes por abordar parte de los objetivos planteados, se incluyen en los apartados de datos complementarios, junto con el material suplementario publicado.





# 1. EFECTO DE LA DIETA MATERNA RESTRINGIDA

Se desarrollaron dos modelos, en el primero se valoraron los efectos de la restricción preconcepcional y gestacional combinadas al nacimiento (**artículo 2**), y su impacto en la edad adulta (**artículo 3**). En el segundo modelo se quiso comprobar si los efectos observados al nacimiento se podrían atribuir sólo a la restricción calórica gestacional (**artículo 4**)



## 1.1 Efecto de la restricción calórica implementada durante el periodo preconcepcional y gestacional: Impacto en los niveles de endocannabinoides al nacimiento de la descendencia.

### 1.1.1 Artículo 2

*Maternal caloric restriction implemented during the preconceptional and pregnancy period alters hypothalamic and hippocampal endocannabinoid levels at birth and induces overweight and increased adiposity at adulthood in male rat offspring.*

El artículo estudia el impacto de la dieta materna restringida al 20 % durante el periodo preconcepcional y gestacional en los niveles de endocannabinoides y lípidos relacionados de las crías macho, junto con su asociación con respuestas conductuales y parámetros relacionados con el metabolismo en etapas posteriores de la vida. Además, se muestran los efectos de la dieta materna restringida en las madres, específicamente en parámetros relacionados con la fertilidad, la ingesta calórica y ganancia de peso a lo largo del periodo perinatal. Se evalúan los resultados neonatales tras la exposición a la restricción calórica materna, ahondando en el peso al nacimiento y en el tamaño de la camada, además de en los endocannabinoides y lípidos relacionados en hipotálamo, hipocampo y bulbo olfatorio. Se evalúan también los parámetros de crecimiento e ingesta calórica hasta la etapa adulta, junto con el impacto de esa dieta en el periodo perinatal sobre ciertas respuestas conductuales (conductas relacionadas con la ansiedad, preferencia por chocolate y respuesta locomotora). Por primera vez, este artículo vincula la exposición a una dieta materna restringida con alteraciones en los niveles de endocannabinoides y/o lípidos relacionados en la descendencia, en dos estructuras claves para el metabolismo y control emocional, concretamente el hipotálamo e hipocampo. Estas alteraciones, a su vez se asocian con el desarrollo alteraciones conductuales (conductas relacionadas con la ansiedad) y metabólicas (alteración en los parámetros de crecimiento y adiposidad) en etapas posteriores de la vida.



# Maternal Caloric Restriction Implemented during the Preconceptional and Pregnancy Period Alters Hypothalamic and Hippocampal Endocannabinoid Levels at Birth and Induces Overweight and Increased Adiposity at Adulthood in Male Rat Offspring

María Teresa Ramírez-López<sup>1</sup>, Mariam Vázquez<sup>1,2</sup>, Laura Bindilla<sup>3</sup>, Ermelinda Lomazzo<sup>3</sup>, Clementine Hofmann<sup>3</sup>, Rosario Noemí Blanco<sup>1</sup>, Francisco Alén<sup>1</sup>, María Antón<sup>1</sup>, Juan Decara<sup>2</sup>, Rocío Arco<sup>2</sup>, Daniel Ouro<sup>1</sup>, Laura Orio<sup>1</sup>, Juan Suárez<sup>2</sup>, Beat Lutz<sup>3</sup>, Raquel Gómez de Heras<sup>1\*</sup> and Fernando Rodríguez de Fonseca<sup>1,2\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Johannes Gräff,  
EPFL, Switzerland

### Reviewed by:

Bruno Conti,  
The Scripps Research Institute, USA  
Oscar Prospéro-García,  
National Autonomous University of  
Mexico, Mexico

### \*Correspondence:

Raquel Gómez de Heras  
rgomezhe@psi.ucm.es  
Fernando Rodríguez de Fonseca  
fernando.rodriguez@ibima.eu

Received: 12 August 2016

Accepted: 17 October 2016

Published: 01 November 2016

### Citation:

Ramírez-López MT, Vázquez M, Bindilla L, Lomazzo E, Hofmann C, Blanco RN, Alén F, Antón M, Decara J, Arco R, Ouro D, Orio L, Suárez J, Lutz B, Gómez de Heras R and Rodríguez de Fonseca F (2016) Maternal Caloric Restriction Implemented during the Preconceptional and Pregnancy Period Alters Hypothalamic and Hippocampal Endocannabinoid Levels at Birth and Induces Overweight and Increased Adiposity at Adulthood in Male Rat Offspring. *Front. Behav. Neurosci.* 10:208. doi: 10.3389/fnbeh.2016.00208

<sup>1</sup> Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, <sup>2</sup> Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga, Universidad de Málaga, Málaga, Spain, <sup>3</sup> Institute of Physiological Chemistry, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University of Mainz, Mainz, Germany

Exposure to inadequate nutritional conditions in critical windows of development has been associated to disturbances on metabolism and behavior in the offspring later in life. The role of the endocannabinoid system, a known regulator of energy expenditure and adaptive behaviors, in the modulation of these processes is unknown. In the present study, we investigated the impact of exposing rat dams to diet restriction (20% less calories than standard diet) during pre-gestational and gestational periods on: (a) neonatal outcomes; (b) endocannabinoid content in hypothalamus, hippocampus and olfactory bulb at birth; (c) metabolism-related parameters; and (d) behavior in adult male offspring. We found that calorie-restricted dams tended to have a reduced litter size, although the offspring showed normal weight at birth. Pups from calorie-restricted dams also exhibited a strong decrease in the levels of anandamide (AEA), 2-arachidonoylglycerol (2-AG), arachidonic acid (AA) and palmitoylethanolamide (PEA) in the hypothalamus at birth. Additionally, pups from diet-restricted dams displayed reduced levels of AEA in the hippocampus without significant differences in the olfactory bulb. Moreover, offspring exhibited increased weight gain, body weight and adiposity in adulthood as well as increased anxiety-related responses. We propose that endocannabinoid signaling is altered by a maternal caloric restriction implemented during the preconceptional and pregnancy periods, which might lead to modifications of the hypothalamic and hippocampal circuits, potentially contributing to the long-term effects found in the adult offspring.

**Keywords:** maternal undernutrition, endocannabinoids, hypothalamus, hippocampus, rat, development, metabolism, behavior

## INTRODUCTION

The World Health Organization has alerted about the increased prevalence of non-communicable diseases such as obesity, hypertension or diabetes, and has pointed out the importance to implement effective interventions in order to avoid the harmful consequences of these pathologies (World Health Organization, 2014). Concerning measures of prevention and treatment, it is important to take into consideration that many of these diseases might have an early origin. Indeed, several epidemiological studies have demonstrated a correlation between reduced fetal growth and the development of features of metabolic syndrome later in life (Barker and Osmond, 1988; Hales et al., 1991; Barker et al., 1993). These data together with the evidence from animal studies, led to postulate that early nutritional insults could have an impact on the health later in life, through a process known as nutritional programming (Lucas, 1991; Barker, 2007).

Decreased weight gain during pregnancy and poor maternal nutritional conditions have been associated to low weight at birth (Institute of Medicine, 2009). In Western societies, despite the fact that excessive gestational weight gain is far more common (Gould Rothberg et al., 2011), the consequences of weight gain below the recommendations should be contemplated as well. For instance, women displaying eating disorder symptoms may not be able to reach an adequate gestational weight gain according to their pre-gestational body mass index (Treasure and Russell, 1988; Micali et al., 2007; Institute of Medicine, 2009), which may lead to increased risk of preterm births or delivery of babies of smaller size (Linna et al., 2014). Additionally, in obese and normoweight women, decreased weight gain during pregnancy may reduce the risk of suffering from maternal obstetrical complications but also increase the possibility of newborns small for their gestational age (Kapadia et al., 2015). Consequently, an optimal weight gain during pregnancy seems critical to avoid adverse neonatal outcomes. Therefore, monitoring the maternal nutritional status in the early stages of the pregnancy, including the periconceptional period, and determining whether the offspring are at risk of developing metabolic disorders later in life represent a crucial point to investigate.

Inadequate nutritional conditions during both preconceptional period and early stages of embryonic development can strongly affect the programming process. Animal models of maternal undernutrition have provided further biological information on the long-term consequences of disturbing normal nutritional patterns. These studies have identified that both the pre/periconceptional and gestational malnutrition resulted in an outcome consistent with the metabolic and behavioral effects observed in humans exposed to undernutrition in critical windows of development. Thus, studies adopting animal models of suboptimal *in vitro* fertilization/culture have demonstrated robust metabolic alterations resulting in obesity and hepatic steatosis in the offspring (Fernández-Gonzalez et al., 2004; Serrano et al., 2014). Additionally, evidence from animal models have shown that either caloric restriction or weight loss during the periconceptional/gestational period could lead

to epigenetic alterations (Raychaudhuri et al., 2008), developmental impairment of the hypothalamus (Sebert et al., 2011), altered leptin signaling (Bouret et al., 2004), alterations in blood pressure, adrenocortical growth or hypothalamus-pituitary adrenal axis in the offspring (Edwards and McMillen, 2002; McMillen et al., 2004; Zhang et al., 2013). These events may occur independently of the pre-pregnancy maternal body weight or whether an adequate maternal nutrition is provided in the later phases of pregnancy.

In addition to the metabolic dysregulations resulting from an inadequate programming, behavioral abnormalities in offspring after altered nutritional conditions during pregnancy have been reported. For instance, suboptimal *in vitro* culturing of embryos resulted in anxiety and learning deficits in adults (Fernández-Gonzalez et al., 2004), whereas caloric restriction during pregnancy altered feeding behavior, induced hyperphagia (Breton et al., 2009; Palou et al., 2010), modified food preferences (Lussana et al., 2008; Palou et al., 2010; Lukaszewski et al., 2011) and impaired anxiety-related behaviors in several species, including humans (Erhard et al., 2004; Nomura et al., 2007; Akitake et al., 2015).

Although as described above, many signaling systems can be affected by maternal undernutrition, to date, little is known about the contribution of the endocannabinoid system in these processes, despite the connection of this system with crucial biologic pathways, such as leptin (Di Marzo et al., 2001), and its involvement in energy metabolism, feeding behavior and emotional control (Lutz, 2009; Alén et al., 2013; Lutz et al., 2015). The endocannabinoid system plays a pivotal role in brain development (Maccarrone et al., 2014) and the disruption of endocannabinoid signaling in early stages of development has been associated to disturbances in neuronal activity, deficient cortical connections and behavior alterations (Rodríguez de Fonseca et al., 1991; Antonelli et al., 2005; Bernard et al., 2005; Moreno et al., 2005; de Salas-Quiroga et al., 2015). Moreover, the type of diet can modify the endocannabinoid content in different tissues, including the brain during development (Berger et al., 2001; Matias et al., 2003; Ramírez-López et al., 2016). This could be explained in part because the two main endocannabinoids, anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), derive from arachidonic acid (AA). Moreover, the arachidonic acid is a derivative of the linoleic acid, an essential dietary n-6 fatty acid (Hansen and Artmann, 2008). Therefore, an inadequate maternal diet might alter the endocannabinoid signaling and disturb the establishment of circuitries regulating metabolism, learning and emotional control, leading to metabolic and neurobehavioral abnormalities later in life (Keimpema et al., 2013; Ramírez-López et al., 2016). However, further investigation is necessary to clarify the role of the endocannabinoid system in these processes.

Based on this evidence, in the present study, we investigated the impact of a moderate maternal caloric restriction, implemented during the preconceptional and pregnancy period, on the levels of endocannabinoids and N-acyl ethanolamides

(NAEs) in brain structures involved in metabolism and emotional responses, such as hypothalamus, hippocampus and olfactory bulb at birth. The neonatal outcomes were also assessed and the offspring were followed until adulthood to determine the impact of maternal diet on metabolism-related parameters and behavior. We propose that endocannabinoid signaling can be altered by a moderate calorie-restricted diet implemented before pregnancy and during pregnancy, and this alteration might be associated to metabolic and behavior abnormalities in the offspring later in life.

## MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Animal Ethics Committee of the Complutense University of Madrid. Additionally, experiments were performed in compliance with Spanish regulations (RD 53/2013 178/2004) and with the European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

### Animals, Diets and Experimental Design

The study was carried out initially in adolescent female Wistar rats (Harlan, Barcelona, Spain). Animals were allowed to acclimate for at least 4 weeks before the diet assignment. Rats were handled and individually housed at a 12 h light-dark cycle with temperature of  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Two weeks before the diet assignment, food intake and body weight gain were monitored weekly. After the acclimatization period, animals were randomly assigned to control ( $n = 9$ ) or caloric restriction diet ( $n = 15$ ). At this stage, no statistical significant difference in body weight among groups was found (average weight  $240.7 \pm 3.4$  g).

Control rats were given free access to standard chow (Standard chow SAFE A04, Panlab, Barcelona, Spain). The standard chow provided 16.1% of protein, 60% carbohydrate, 3.1% fat, 4% fiber, 0.0025% sodium and 2.9 kcal/g as energy content. In contrast, calorie-restricted dams were given a daily amount of food corresponding to 80% of the caloric intake of control dams, which was adjusted according to the body weight (20% of caloric restriction). We selected this food restriction schedule as a moderate calorie-restricted diet has been demonstrated to be sufficient to induce long-lasting alterations in offspring without affecting fertility (Terry et al., 2005; Palou et al., 2010). Water was provided *ad libitum* in both animal groups.

From the beginning of the experiment, food intake and weight were measured daily and cumulative weight gain and caloric intake were calculated weekly. Estrous cycle was evaluated every day to check cycle regularity and duration of every stage. Two weeks after the beginning of the experimental diets, females were allowed to mate with a male of the same strain. Each male rat was mated with females from both groups. The mating phase occurred in the female cage within 24 h from the proestrus. During the mating phase, food restriction was abolished and animals were allowed to eat *ad libitum* in order to avoid misinterpretation of individual food consumption or interferences in copulation (Terry et al., 2005; Klingerman et al., 2011). Twenty-four hours after proestrus, the males

were returned to their cage and restricted dams carried on with their assigned diets. Then, vaginal smear was evaluated to detect the presence of vaginal plug or spermatozoa. The day these signs of successful mating were found, which confirmed pregnancy, was designated as gestational day 0 (GD 0). In the case of no pregnancy signs, the overall procedure was repeated in the following proestrus period.

During the gestational period, food intake and weight were measured daily and female rats were maintained on the calorie-restricted diet until the GD 20, 2 days previous to birth (GD 20), when restricted diet ended (Figure 1). The birth day was defined as postnatal day 0 (PN0). Within 14 h after birth, pups were weighed and sexed. Litter size was adjusted to eight pups, consisting of four males and four females. The remaining pups were quickly sacrificed by decapitation and brains were collected for further endocannabinoid analysis.

Throughout the lactation period, calorie-restricted and control rat dams were provided with standard chow *ad libitum*. Food intake and dams'/pups' weight were measured 3 days per week during this period. At PN 22–23, offspring from both types of perinatal diet were weaned onto standard chow diet ( $n = 15$  and  $n = 23$ , for control and caloric restriction group, respectively). Rats belonging to the same litter from each perinatal diet group were housed together (2–3 rats/cage). Dams were sacrificed. During the post-weaning period, weight and food intake were measured weekly. Behavioral studies were performed in adolescence and adulthood (Figure 1). At the 5th postnatal month, three quarters of the male offspring were sacrificed.

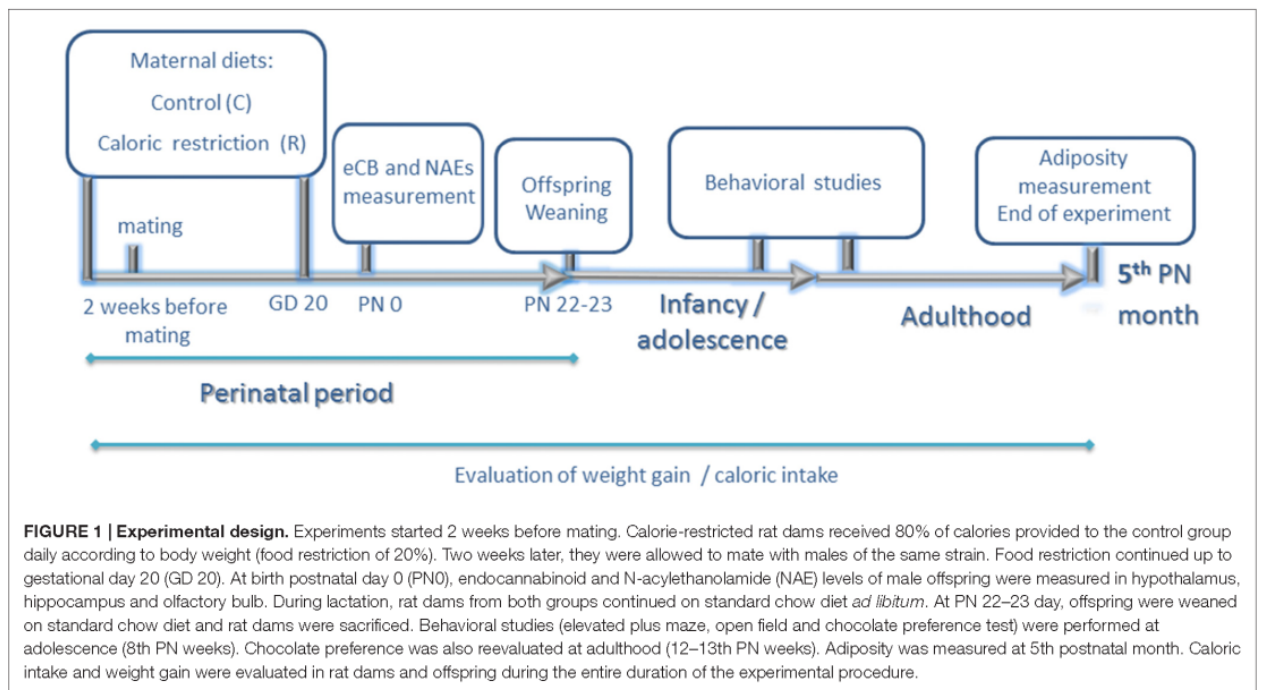
All experiments in offspring were performed in males. The term “perinatal” was used to refer to pregestational, gestational and lactation periods.

### Evaluation of Parameters Related to Fertility

The evaluation of estrous cycle started 2 weeks before mating and it was performed daily until post-mating day. Every morning, in the 2 h following the beginning of the dark phase, each female was moved to the experimental room. A pipette filled with 0.2 ml of clean water was inserted gently in the vagina. Then, vaginal fluid was collected by aspiration and one drop of it was placed on a glass slide and observed under a light microscope. The stages of estrous cycle identified were proestrus, estrus, metestrus and diestrus (Marcondes et al., 2002). Prolonged diestrus was considered when diestrus lasted for three consecutive days or more.

### Caloric Intake and Adiposity

Food intake was determined by subtracting the amount of each food type left in the cage from the total amount of food provided. In weaned offspring, the individual food intake was determined by dividing the total food intake from each cage by the number of pups per cage. Comparisons among groups were carried out by calculating cumulative caloric intake relative to body weight (Kcal/Kg) as well as weight gain in each period of the study. Furthermore, the percentage of increase in body weight and



caloric intake in rat dams was calculated at the end of the caloric restriction diet and specifically, on GD 20 and 21 and during the lactation period, from PN 1–22.

Adiposity was estimated by calculating the percentage of abdominal fat weight over total body weight at the time animals were sacrificed. Rats were weighed immediately before death and sacrificed by decapitation after administration of Equitesin<sup>®</sup> (3 mg/kg). Then, perirenal and perigonadal fat deposits were dissected and weighed. The sum of both types of fat was used to determine the percentage of abdominal fat.

### Endocannabinoid Measurements

At PN0, male offspring chosen to be sacrificed from the two experimental groups were decapitated during the 2nd/3rd h of the dark phase and brains were quickly removed and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until brain region isolation. To avoid the possibility of variable outcomes among litters, brains from at least three litters per group were used to carry out endocannabinoid measurements (control pups  $n = 7-5-3$  and pups from restricted dams  $n = 16-11-9$ , for hypothalamus, hippocampus and olfactory bulb, respectively). For the isolation of the brain regions selected, brains were thawed in cold Tris-HCl buffer (50 mM, pH = 7.40) and the entire hypothalamus, right hippocampus and right olfactory bulb were quickly isolated and immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until lipid extraction. The overall isolation procedure was carried out in less than 7 min for all animals to avoid *ex vivo* production/degradation of endocannabinoids.

For lipid extraction, pre-cooled steel balls of 5 mm were added to pre-cooled tubes containing the tissue. A solution of deuterated endocannabinoids (AEA-d4, 2-AG-d5, AA-d8,

MAEA, oleoylethanolamide (OEA)-d2, palmitoylethanolamide (PEA)-d4 and 1-AG-d5, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) in acetonitrile was added to the tissue along with 300  $\mu\text{L}$  of ice-cold 0.1 M formic acid and 300  $\mu\text{L}$  of ethylacetate/hexane (9:1, v/v). Then, the samples were homogenized with a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) for 60 s at 30 Hz. Subsequently, the samples were centrifuged for 10 min at 5000 g and  $4^{\circ}\text{C}$ . The organic phase was removed and evaporated under a gentle stream of nitrogen at  $37^{\circ}\text{C}$ . The aqueous phase was further used for protein content determination. The lipid extract was re-dissolved in 50  $\mu\text{L}$  acetonitrile/water (1:1, v/v) and quantitative analysis of the endocannabinoid levels was carried out by liquid chromatography-multiple reaction monitoring (LC-MRM). The concentrations of internal standards, as well as the calibration curves, were set and tailored using test hypothalamic hippocampal and olfactory bulb tissues. LC/MRM conditions for quantitative analysis of the endocannabinoids were set as endocannabinoid levels were normalized to the corresponding protein content of the tissues as previously reported (Wenzel et al., 2013; Bindila and Lutz, 2016).

For protein quantification, the BCA method (bicinchoninic acid assay) was used and the measurements performed by using a FLUOstar Galaxy (BMG Lab technologies).

### BEHAVIORAL STUDIES

#### Elevated Plus Maze

Anxiety-related behaviors were evaluated in handled animals with the elevated plus maze, at the 7–8th PN weeks (adolescence period). The elevated plus-maze (Panlab, Barcelona, Spain) consisted of a cross-shaped platform made of black and gray

plastic. The platform was elevated 65 cm from the floor and had two opposing open arms (50 cm × 10 cm) and two closed arms of the same size. A central area of 10 cm connected all arms. The closed arms were fenced by 50-cm high opaque walls. The light intensity was adjusted at 150 lux in the open arms and 80 lux in the closed arms. The test was performed after 5 h from the beginning of the dark phase. When the test started, each rat was placed in the central area facing one of the open arms and opposite to the experimenter position. Then, the animal was allowed to explore the maze freely for 5 min. After this time, the rat was moved back to the home cage and the maze was cleaned. The number of open-arm and closed-arm entries and the percentage of time spent on open and closed arms were determined by a computer-controlled system recording the interruptions of infrared photo beams located along each arm. Data were analyzed by using the MAZE soft software (Panlab, Barcelona, Spain). Animals that fell off the maze during the test were excluded from the analysis.

### Open Field

Locomotor activity and anxiety-related behavior were evaluated with the open field test in the 2 days following the elevated plus maze test. The open field consisted of a square arena (80 cm × 80 cm and 40 cm high) virtually divided into a peripheral zone and a central zone (40 cm × 40 cm). It was made of plywood and was located in an experimental room illuminated with low light intensity (30 lux). The test was performed 5 h after the beginning of the dark phase. Each rat was positioned in the center of the open field and was allowed to explore freely for 5 min. After this time, the rat was moved back to the home cage and the arena was cleaned. A video camera installed above the arena was connected to a monitor and a video tracking motion analysis system (Smart, Panlab, Harvard Apparatus, Spain), which measured the total distance traveled (cm) and mean speed (cm/s). The program calculated the percentage of time spent in the central area as well as the number of entries to the center zone, as an index of anxiety-like behavior.

### Chocolate Preference Test

The chocolate preference test was performed at adolescence (8–9th PN weeks) and adulthood (12–13th PN weeks). At the beginning of the test, animals were single-housed in new cages provided with both types of food (standard chow and the mixture of chocolates) and water *ad libitum*. Food intake for both types of food and animal weight was determined 24 h after the beginning of the test. Chocolate preference was calculated as the percentage of chocolate eaten over total food provided, a measure that was independent of the body weight of the animal and that only reflects food preference.

### Statistical Analysis

All data are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis of results was performed by using the GraphPad Prism version 5.0 program (GraphPad Software Inc., San Diego, CA,

USA) and SPSS 15.0 for windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Weight gain over the time and caloric intake were analyzed by one-way repeated measures analysis of variance (ANOVA). Multiple comparisons were assessed by Bonferroni *post hoc* test. To assess the differences among groups on fertility-related parameters the chi-squared test was adopted. Results from the chocolate preference test were analyzed by two-way ANOVA with group (control vs. free-choice animals) and age period used as variables. Further analyses were performed by using the Student *t*-test, when data passed normality requirements (D'Agostino-Pearson test) or U Mann Whitney test. A *p*-value below 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### Impact of Caloric Restriction on Rat Dams During the Perinatal Period

#### Impact of Caloric Restriction on Fertility Parameters

The evaluation of estrous cycle was performed daily during the 2 weeks before mating in order to detect alterations in regularity and duration of the different stages of the estrous cycle.

After the beginning of the experiment, 6 over 15 calorie-restricted dams suffered from prolonged diestrus or irregular cycle, whereas only 1 over 9 control rat dams did. However, chi-squared test did not show significant differences between groups ( $\chi^2_{df1} = 2.272$ ,  $p > 0.05$ ; data not shown). Regarding the number of days required to become pregnant, dams assigned to restricted diet had higher tendency to spend 2 days or more with a male in proestrus (chi-squared test:  $\chi^2_{df1} = 3.646$ ,  $p = 0.056$ ; data not shown). However, successful mating was finally achieved in both experimental groups.

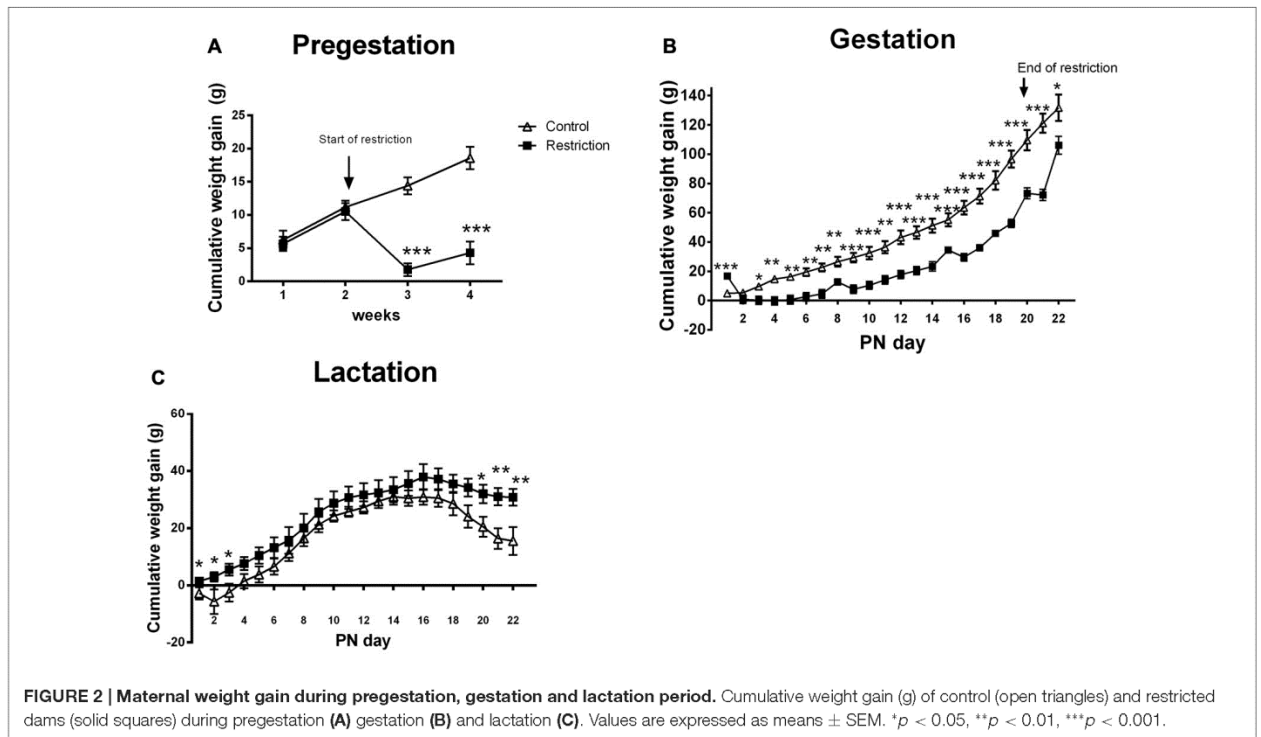
These results indicate that a moderate preconceptional caloric restriction do not affect fertility, despite the subtle changes observed during the estrous cycle and mating phase.

#### Effect of Caloric Restriction on Maternal Weight Gain

Repeated measures ANOVA revealed that dams from caloric restriction group gained less weight than controls before pregnancy ( $F_{(1,23)} = 19.538$ ,  $p < 0.001$ ). The differences started to be significant after the first week from the beginning of the restriction diet ( $F_{(1,23)} = 65.361$ ,  $p < 0.001$ ; **Figure 2A**). At mating, calorie-restricted dams tended to weigh less as compared to control dams (mean weight control vs. restriction:  $250.1 \pm 8.921$  vs.  $235.4 \pm 2.882$ ; Student's *t*-test control vs. restriction group:  $t = 1.886$ ,  $p = 0.07$ , data not shown).

During the entire gestational period, the cumulative weight gain was decreased in the caloric restriction group (repeated measures ANOVA:  $F_{(1,20)} = 23.902$ ,  $p < 0.001$ ). However, Bonferroni multiple comparisons showed that restricted dams gained more weight at GD 0 ( $F_{(1,20)} = 23.9$ ,  $p < 0.001$ ), probably because they were allowed to eat *ad libitum* during the mating phase. Moreover, the differences in weight gain between groups were mitigated at GD 21, when restricted diet ended and calorie-restricted pregnant dams were allowed to eat *ad libitum* ( $F_{(1,20)} = 5.526$ ,  $p < 0.05$ ; **Figure 2B**).





Accordingly, the percentage of increase in body weight between GD 20 and 21 was higher for restricted dams as compared to controls (U Mann Whitney test,  $U = 2.000$ ,  $p < 0.001$ ; Data not shown). Despite the change in body weight at the end of diet restriction, at PN0 calorie-restricted dams still tended to be leaner than controls (mean weight and SEMs control vs. restriction:  $291 \pm 12.06$  ( $n = 9$ ) vs.  $273 \pm 2.95$  ( $n = 15$ ); Student's  $t$ -test:  $t = 1.820$ ,  $p = 0.08$ ; data not shown).

Regarding the cumulative weight gain during the entire lactation period, no significant differences between groups were found (ANOVA of repeated measures,  $F_{(1,22)} = 2.389$ ,  $p = 0.136$ ). However, Bonferroni multiple comparisons showed that calorie-restricted dams gained more weight at the beginning and at the end of lactation as compared to controls ( $F_{(1,22)} = 4.811$ ,  $p < 0.05$ ;  $F_{(1,22)} = 4.850$ ,  $p < 0.05$ ;  $F_{(1,22)} = 5.061$ ,  $p < 0.05$ ;  $F_{(1,22)} = 5.258$ ,  $p < 0.05$ ;  $F_{(1,22)} = 9.428$ ,  $p < 0.01$  and  $F_{(1,22)} = 8.301$ ,  $p < 0.01$ , at PN day 1, PN day 2, PN day 3, PN day 20, PN day 21 and PN day 22, respectively; **Figure 2C**). Consequently, the percentage of increase in body weight between PN day 1 and 22 was higher for restricted dams than controls ( $5.578\% \pm 1.83\%$  vs.  $11.24 \pm 1.076\%$ ; Student's  $t$ -test,  $t = 2.854$ ,  $p < 0.01$ ; data not shown).

#### Effect of Caloric Restriction on Maternal Caloric Intake

Repeated measures ANOVA demonstrated that cumulative caloric intake in rat dams from diet restriction group

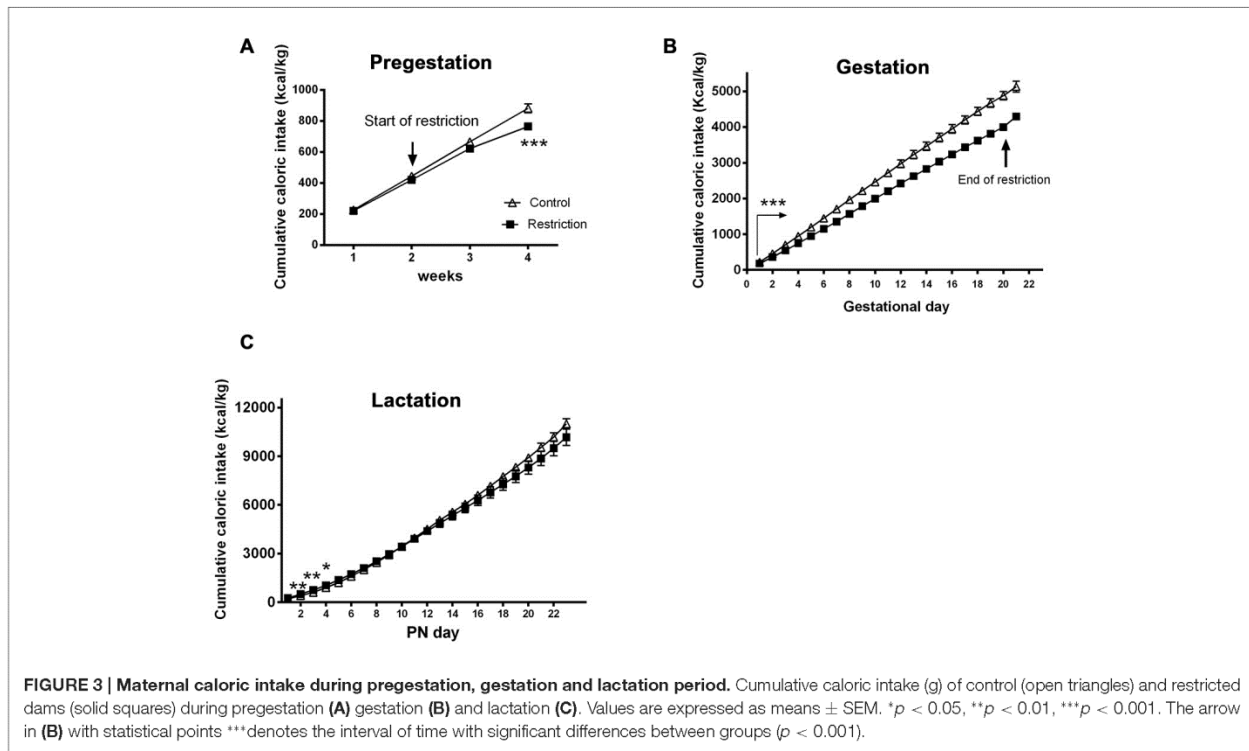
was significantly lower than controls before pregnancy ( $F_{(1,23)} = 8.798$ ,  $p < 0.01$ ; **Figure 3A**). These differences were particularly evident after 2 weeks from the beginning of the restricted diet ( $F_{(1,23)} = 20.228$ ,  $p < 0.001$ ; **Figure 3A**), as revealed by Bonferroni multiple comparisons.

During the overall gestational period, calorie-restricted dams continued consuming less calories per kg (repeated measures ANOVA  $F_{(1,20)} = 62.491$ ,  $p < 0.001$ ; **Figure 3B**). As restricted mothers were allowed to eat *ad libitum* at day 20, they presented increased caloric intake compared to controls between GD 20 and 21 (Student's  $t$ -test:  $t = 4.550$ ,  $p < 0.001$ ; data not shown).

Additionally, repeated measures ANOVA indicated no significant differences between groups in cumulative caloric intake (g/kg) during the entire lactation period ( $F_{(1,22)} = 0.330$ ,  $p > 0.05$ ). However, the days immediately after birth, restricted mothers tended to be hyperphagic ( $F_{(1,22)} = 3.045$ ,  $p = 0.09$ ;  $F_{(1,22)} = 9.523$ ,  $p < 0.01$ ;  $F_{(1,22)} = 11.273$ ,  $p < 0.01$ ,  $F_{(1,22)} = 4.896$ ,  $p < 0.05$  and  $F_{(1,22)} = 3.365$ ,  $p = 0.08$ , at PN day 1, PN day 2, PN day 3, PN day 4 and PN day 5, respectively; **Figure 3C**).

#### Effect of Maternal Caloric Restriction on Birth Outcomes

Control pups were born between GD 21 or 22, whereas all pups from calorie-restricted dams were born at GD 22 (data not shown). All pups were born during the light phase. At birth, Student's  $t$ -test analysis revealed that offspring from preconceptional/pregnancy calorie-restricted dams did not differ in weight from control pups, either when analysis was done



in both sexes together or in male and female separately (data not shown). However, litter size tended to be lower in the diet restriction group ( $11.67 \pm 0.81$  vs.  $8.73 \pm 1.01$ ; Student's  $t$ -test,  $t = 2.005$ ,  $p = 0.05$ ). Indeed, a significant decreased litter size was found in female ( $6.111 \pm 0.67$  vs.  $4.067 \pm 0.49$ , Student's  $t$ -test,  $t = 2.484$ ,  $p < 0.05$ ) but not in male pups.

## Effect of Maternal Caloric Restriction on Brain Endocannabinoid and N-acylethanolamide Levels in Newborn Male Offspring

### Hypothalamic Endocannabinoid and N-acylethanolamide Levels in Male Offspring at Birth

U Mann Whitney test showed significant differences between groups in hypothalamic endocannabinoids and/or NAEs at birth. Specifically, male pups from calorie-restricted dams presented significantly lower levels of AEA ( $U = 2.000$ ,  $p < 0.001$ ), 2-AG ( $U = 3.000$ ,  $p < 0.001$ ) and AA ( $U = 4.000$ ,  $p < 0.001$ ; **Figures 4A–C**, respectively). Concerning NAE levels, no significant differences between groups was found in OEA levels ( $U = 35.50$ ,  $p > 0.05$ ; **Figure 4D**), although PEA levels were significantly decreased in offspring from calorie-restricted dams as compared to controls ( $U = 17.00$ ,  $p < 0.05$ ; **Figure 4E**).

These results indicate that a prolonged caloric restriction during the preconceptional/pregnancy period induces a strong decrease in the levels of the predominant endocannabinoids

(AEA and 2-AG), their precursor (AA) as well as in PEA levels in the hypothalamus of offspring at PN0.

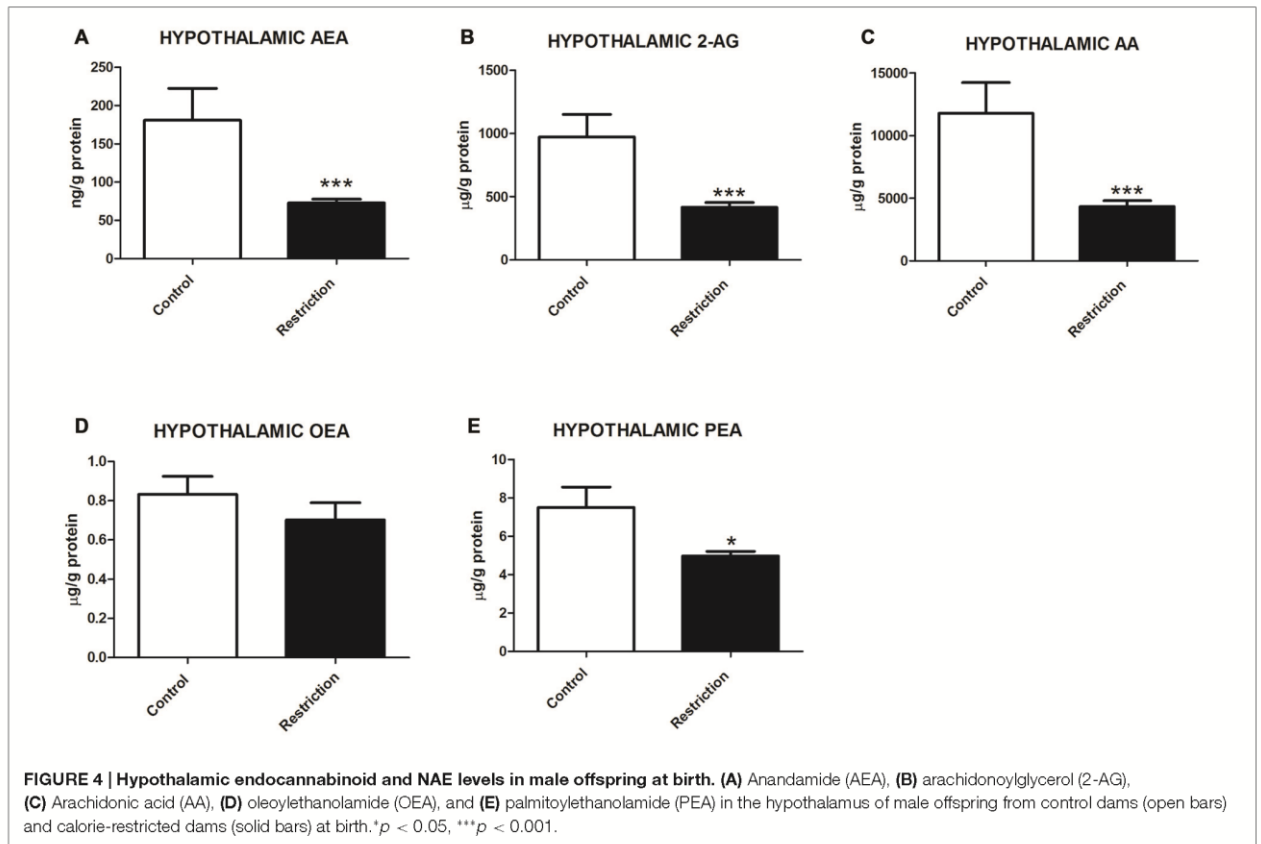
### Hippocampal Endocannabinoid and N-acylethanolamide Levels in Male Offspring at Birth

U Mann Whitney test showed a general propensity to reduced endocannabinoid levels in the hippocampus of offspring from calorie-restricted dams as compared to controls. Specifically, male pups from diet-restricted dams presented significantly decreased levels of AEA ( $U = 9.000$ ,  $p < 0.01$ ; **Figure 5A**), a strong tendency to decreased levels of AA ( $U = 16.00$ ,  $p = 0.05$ ; **Figure 5C**) and a subtle but not significant reduction of PEA ( $U = 19.00$ ,  $p = 0.09$ ; **Figure 5E**). No statistical differences between groups were found either in 2-AG or OEA levels (**Figures 5B,D**, respectively).

Therefore, a prolonged caloric restriction during the preconceptional/pregnancy period predominantly induces decreased levels of AEA in the hippocampus of the offspring at birth.

### Endocannabinoid and N-acylethanolamide Levels in The Olfactory Bulb of Male Offspring at Birth

U Mann Whitney test showed a slight tendency to decreased levels of AEA in the olfactory bulb of offspring from calorie-restricted dams (**Figure 6A**). No significant differences between groups were found in 2-AG, AA and PEA levels (**Figures 6B–D**). The OEA values in olfactory bulb could not be



reliably quantified due to interference of a peak corresponding to an isobaric structure of OEA (data not shown).

## Effect of Maternal Caloric Restriction on Offspring Metabolic-Related Parameters After Birth

### Effect of Maternal Diet on Male Offspring Weight Gain During Lactation Period

Repeated measures ANOVA indicated no differences between groups in weight gain during the lactation period ( $F_{(1,81)} = 0.021$ ,  $p > 0.05$ ). However, at PN day 1 pups from calorie-restricted dams gained more weight than controls ( $F_{(1,81)} = 4.024$ ,  $p < 0.05$ ; **Figure 7A**).

### Post-Weaning Weight Gain, Caloric Intake and Adiposity

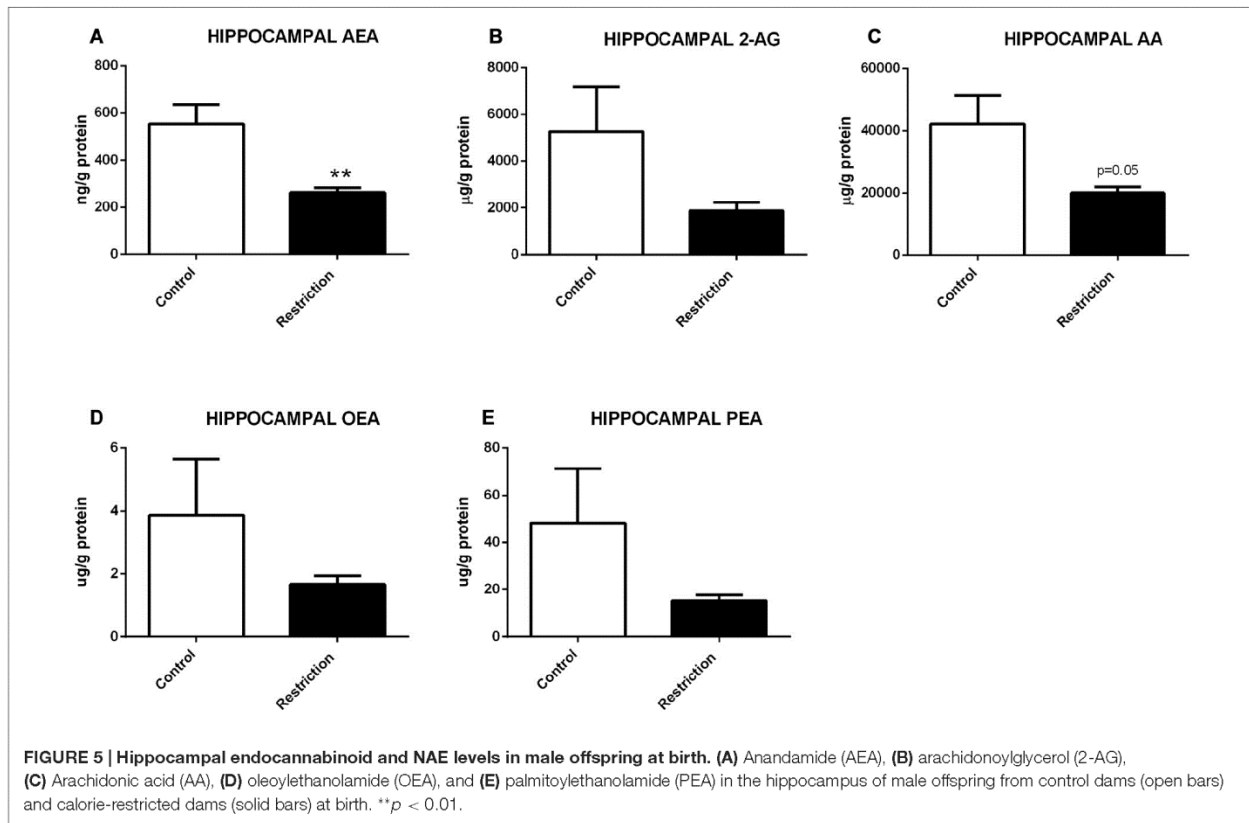
After weaning, repeated measures ANOVA revealed a significant effect of the perinatal diet on male weight gain ( $F_{(1,31)} = 6.132$ ,  $p < 0.05$ ) and a statistically significant interaction between time and perinatal diet ( $F_{(15,17)} = 3.212$ ,  $p < 0.05$ ; **Figure 7B**). Indeed, Bonferroni multiple comparisons showed that offspring from preconceptional/pregnancy diet restricted mothers started to gain more weight at the beginning of adulthood and specifically at the 13th PN week. ( $F_{(1,31)} = 4.693$ ,  $p < 0.05$ ;  $F_{(1,31)} = 8.547$ ,

$p < 0.01$ ;  $F_{(1,31)} = 9.350$ ,  $p < 0.01$ ;  $F_{(1,31)} = 9.806$ ,  $p < 0.01$ ,  $F_{(1,31)} = 12.876$ ,  $p < 0.05$ ;  $F_{(1,31)} = 13.227$ ,  $p < 0.01$  and  $F_{(1,31)} = 17.014$ ,  $p < 0.001$ , at 13th PN week, 14th PN week, 15th PN week, 16th PN week, 17th PN week, 18th PN week and 19th PN week, respectively; **Figure 7B**).

Regarding the variable absolute body weight, repeated measures ANOVA did not show a significant main effect of the perinatal diet on male offspring body weight ( $F_{(1,36)} = 1.185$ ,  $p = 0.284$ ), when considering the entire period as statistical variable. However, the interaction between time and body weight was statistically significant ( $F_{(1,36)} = 2.684$ ,  $p < 0.05$ ). Thus, Bonferroni multiple comparisons revealed that the absolute body weight of offspring from calorie-restricted mothers started to be significantly higher at the 15th PN week ( $F_{(1,36)} = 5.024$ ,  $p < 0.05$ ;  $F_{(1,36)} = 2.539$ ,  $p = 0.120$ ;  $F_{(1,36)} = 4.451$ ,  $p < 0.05$ ;  $F_{(1,36)} = 4.642$ ,  $p < 0.05$ ;  $F_{(1,36)} = 4.642$ ,  $p < 0.05$  and  $F_{(1,36)} = 6.934$ ,  $p < 0.05$ , at 15th PN week, 16th PN week, 17th PN week, 18th PN week and 19th PN week, respectively; data not shown).

Concerning caloric intake, repeated measures ANOVA indicated no statistical differences between groups in this variable, despite the fact that offspring from calorie-restricted dams started to gain more weight in adulthood ( $F_{(1,36)} = 1.865$ ,  $p > 0.05$ ; **Figure 7C**).

Regarding adiposity, male offspring from preconceptional-gestational calorie-restricted dams presented a statistically



significant increase in abdominal fat as compared to control offspring at the 5th PN month (Student's  $t$ -test,  $t = 2.069$ ,  $p < 0.05$ ; **Figure 7D**). These data are consistent with the increased body weight exhibited by these animals.

Taking together, these results show that male offspring from preconceptional-gestational calorie-restricted dams presented higher body weight and weight gain and increased adiposity than controls in adulthood, despite the fact that caloric intake was not changed in these animals.

## Effect of Maternal Diet on Male Offspring Behavior in Postweaning Period

### Anxiety-Like Behavior: Elevated Plus Maze Test and Open Field Test

Student's  $t$ -test and U Mann Whitney test analysis revealed that offspring from calorie-restricted dams showed higher propensity to display anxiety-like behaviors as compared to controls. Indeed, offspring from preconceptional calorie-restricted dams spent significantly less time in the open arms ( $t = 2.213$ ,  $p < 0.05$ ; **Figure 8A**) and longer time in the closed arms of elevated plus maze ( $t = 3.727$ ,  $p < 0.001$ ; **Figure 8B**). However, no differences were found either in the percentage of number of entries in the open arms or in the percentage of entries in the closed arms of the elevated plus maze (data not shown). Regarding the open field test, U Mann Whitney and Student's

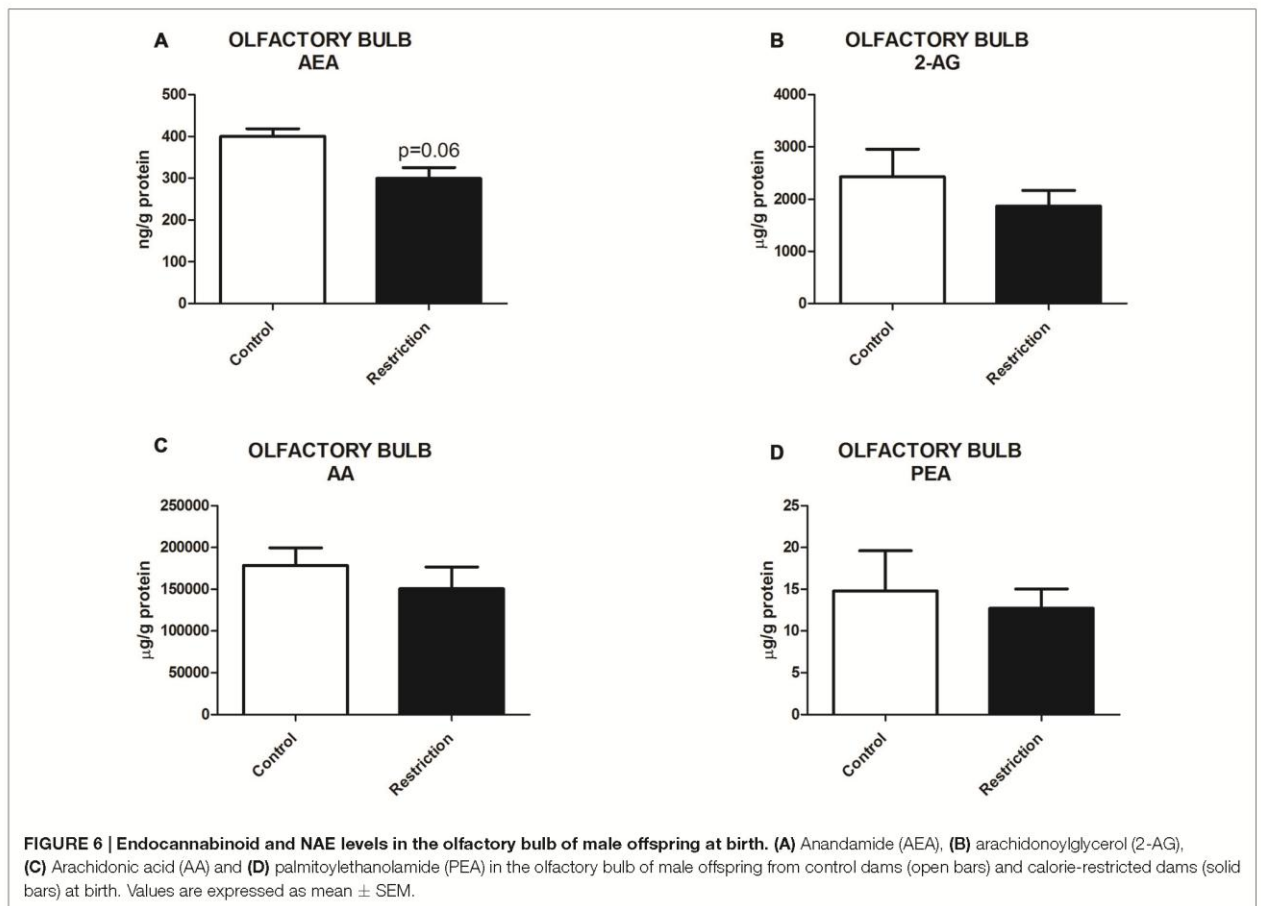
$t$ -test analysis showed that offspring from restricted dams tended to spend less time in the central area of the arena ( $U = 63.00$ ,  $p = 0.08$ ). However, no significant differences between groups were found in the number of entries in the central zone of the arena ( $t = 0.06$ ,  $p > 0.05$ ; data not shown).

### Locomotor Activity: Open Field Test

Student's  $t$ -test analysis showed no significant differences between groups in the total distance traveled in the open field test. In addition, the mean speed was not statistically different between groups (data not shown). These results suggest that alterations in the perinatal diet do not affect locomotor activity in the offspring.

### Chocolate Preference

Two way ANOVA test performed with the chocolate preference test carried out in adolescence and adulthood, showed a statistically significant effect for the factor age period (adolescence vs. adulthood;  $F_{(1,68)} = 32.220$ ,  $p < 0.001$ ). Thus, the preference for chocolate was increased over time in all groups. In contrast, no significant differences in the main effect of perinatal diet and no significant interaction between factors (perinatal diet  $\times$  age time) were found. However, the increment for chocolate preference by age period was slightly different between groups as revealed by Bonferroni multiple comparisons.



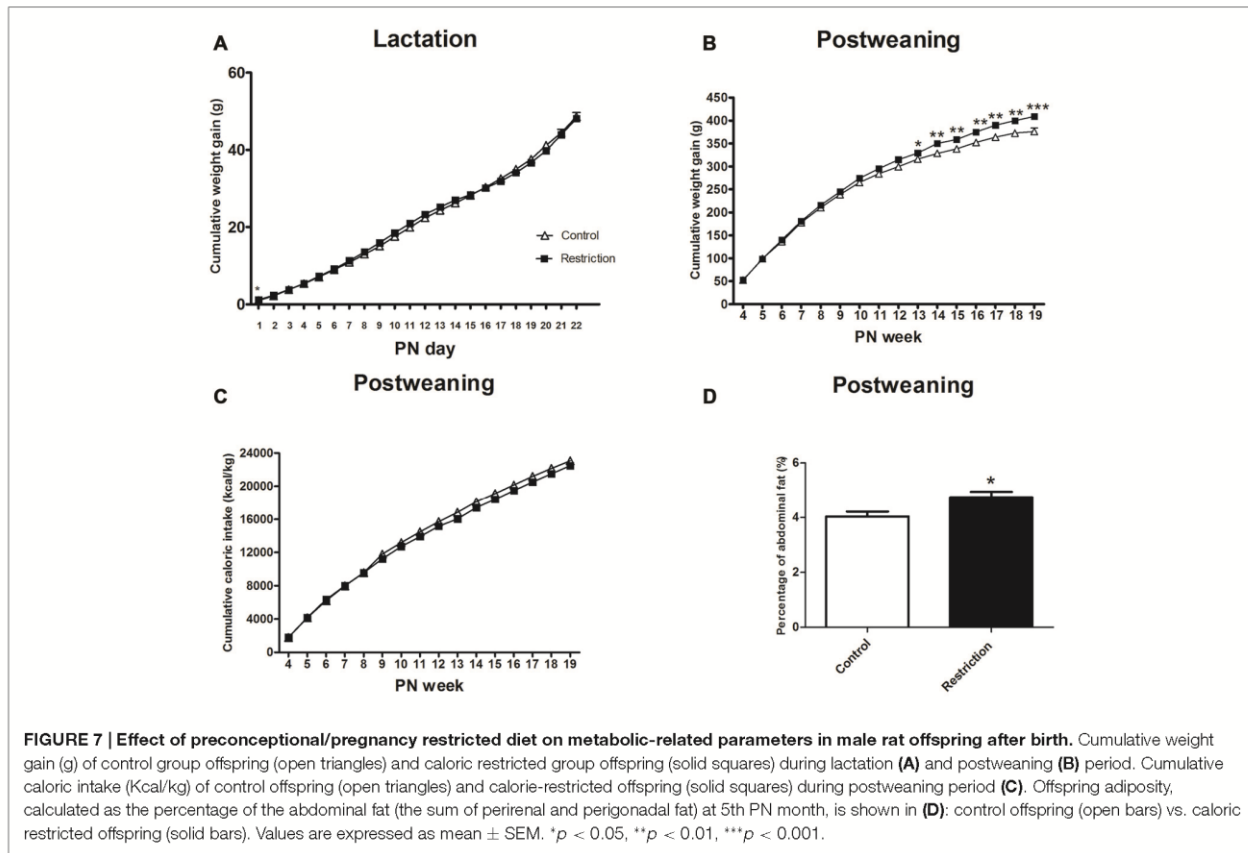
Indeed, although offspring from control dams showed increased chocolate preference in adulthood ( $F_{(1,68)} = 11.613, p < 0.01$ ), offspring from calorie-restricted dams displayed a more pronounced increase for chocolate preference by age period ( $F_{(1,68)} = 23.353, p < 0.001$ ; Data not shown).

## DISCUSSION

In the present study, we have demonstrated that a maternal caloric restriction implemented during the preconceptional/pregnancy period until 2 days prior birth, alters the weight gain during pregnancy and affects the litter size without changing offspring weight at birth. Importantly, this is the first study to demonstrate that this moderate caloric restriction decreases endocannabinoid and/or NAE levels in hypothalamus and hippocampus in male offspring at birth, and that these alterations are associated to overweight, increased adiposity and anxiety-related responses in adulthood. These findings suggest the need for considering the endogenous cannabinoid system as a relevant signaling system involved in metabolic/behavioral programming.

It is important to note that these findings were obtained using a model of moderate caloric restriction that does not affect

fertility, but is sufficient to produce changes in the litter size and the body weight gain of dams (Terry et al., 2005; Palou et al., 2010). This is relevant because more severe diet restriction may have led to increased pre and postimplantational fetus loss. In any case, the weight loss observed along preconceptional diet restriction might have produced an impact in the uterine glands that provide nutrition during the conceptional period and the first stages of pregnancy nutrients, a process known as histiotrophic nutrition (Burton et al., 2002), which might be sufficient to generate the effects observed. In addition, suboptimal nutrient conditions might have affected the embryos, through a process similar to that described in suboptimal *in vitro* culture in rodents, as we have recently shown (Fernández-Gonzalez et al., 2004; Serrano et al., 2014). Intriguingly, despite the decreased maternal weight gain during pregnancy, pups from calorie-restricted dams were not underweight at birth. These findings are consistent with other studies showing that the weight at birth could be unaffected when caloric restriction is implemented in the early stages of pregnancy (Sebert et al., 2009; Palou et al., 2010; Poore et al., 2010). The absence of differences in pups' body weight may be associated to the significant increase in body weight and caloric intake of diet-restricted rat dams when the food restriction ended, which may have determined



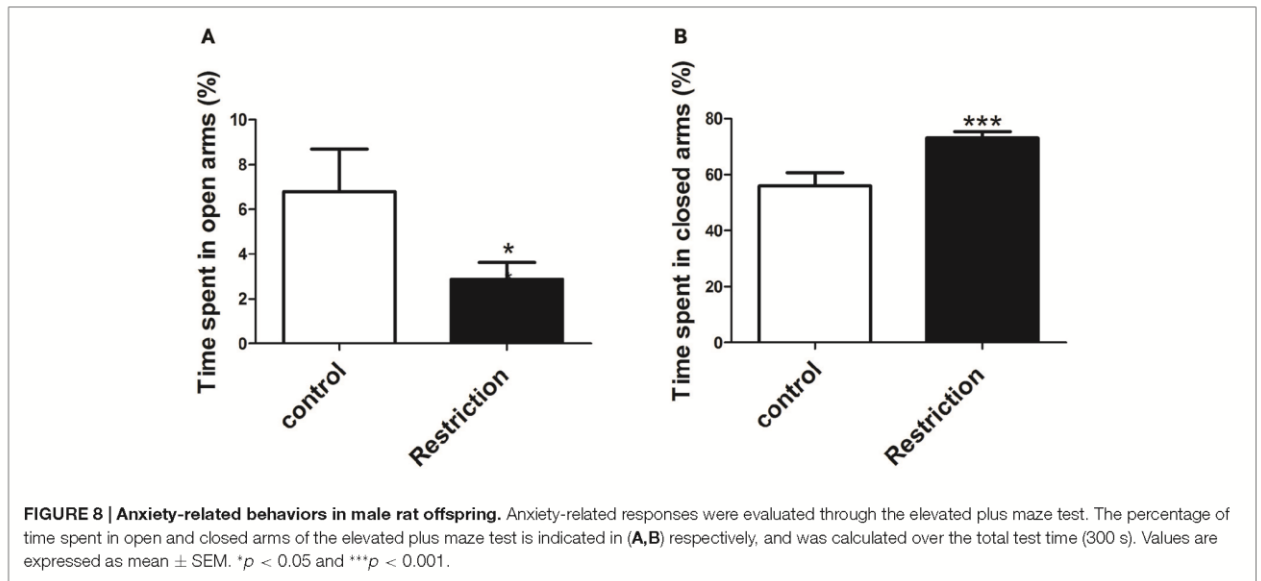
an accelerated weight gain in the fetus, as reported previously (Baik et al., 2014). This hypothesis is supported by the fact that offspring were born 2 days after switching the calorie-restricted dams to *ad libitum* feeding, suggesting that birth occurred only when fetuses reached the appropriate birth weight.

### A Moderate Maternal Caloric Restriction During the Preconceptual/Pregnancy Period Alters Hypothalamic and Hippocampal Endocannabinoid and NAE Levels in Male Offspring at Birth

The endocannabinoid system is a relevant homeostatic network of signals controlling energy expenditure and metabolism (Matias and Di Marzo, 2007; Bermudez-Silva et al., 2010). However, its role in developmental programming has not been studied in depth. To our knowledge, this is the first study investigating the levels of endocannabinoids and NAEs at birth after maternal exposure to restricted feeding during the preconceptual/pregnancy period. Interestingly, we found that offspring from calorie-restricted mothers presented in general reduced levels of endocannabinoids and their precursor, AA, in hypothalamus and hippocampus and a similar tendency in the olfactory bulb, as compared to controls. Reduced AA levels may be explained in part because AA (20:4n-6) derives

from linoleic acid (18:2n-6), which is an essential fatty acid obtained from dietetic sources. Therefore, decreased availability of nutrients after a prolonged calorie-restricted maternal diet might have affected the levels of the precursor (AA) of the two predominant endocannabinoids (AEA and 2-AG). Conversely, reduced eCB levels, which are AA precursors as well, may also have determined in part the reduced levels of AA.

In the hypothalamus, we detected a strong reduction in the level of the main endocannabinoids and AA. These results are in agreement with Matias et al. (2003), showing decreased levels of AEA in weaning offspring from dams previously exposed to a maternal caloric restriction during pregnancy and/or lactation. However, in our experiments we detected more robust alterations in endocannabinoid and NAE levels likely because preconceptual diet restriction may induce more exacerbating effects in the offspring, as reported in both cohort studies (Roseboom et al., 2006) and animal models of undernutrition (Edwards and McMillen, 2002; McMillen et al., 2004; Zhang et al., 2013), despite the lack of change in weight at birth. Consistently, we found reduced endocannabinoid levels in normoweight pups. However, the lack of association between endocannabinoid levels and pup weight is in disagreement with Matias et al. (2003), showing decreased endocannabinoid levels in underweight pups. However, differently from Matias et al. (2003), we measured the



endocannabinoids at birth. Calorie-restricted rat dams tended to weigh less than controls at birth and their endocannabinoid levels might not have been restored to normal. Thus, the endocannabinoid levels in new born rats might reflect the maternal status, due to the fact that long fatty acids can be transferred through the placenta and the fetus are not fully able to modify fatty acid structures (Keimpema et al., 2013). Future research will address these possibilities.

Although the endocannabinoid system has received little attention in the context of nutritional programming, proteins interacting with endocannabinoids, such as leptin and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) have been shown to be altered after maternal exposure to undernutrition (Di Marzo et al., 2001; Keimpema et al., 2014). For instance, after maternal undernutrition, alterations in the surge of leptin and BDNF levels during specific developmental stages have been associated to disruption in the development of the hypothalamic circuit and metabolic disorders later in life (Bouret et al., 2004; Yura et al., 2005; Coupé et al., 2009). These data lead to hypothesize that the endocannabinoid system might be involved in the regulation of these processes as well. Indeed, during the prenatal and postnatal periods endocannabinoids levels reach a peak in concentration, which correlates with neurodevelopment processes occurring in these specific age stages (Berrendero et al., 1999). Moreover, alterations of endocannabinoid signaling by prenatal administration either of cannabinoid receptor agonists, such as THC ( $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol), or antagonists, is associated to impairment in neuronal activity, cortical connections and emotional behavior (Rodríguez de Fonseca et al., 1991; Antonelli et al., 2005; Bernard et al., 2005; Moreno et al., 2005; de Salas-Quiroga et al., 2015). Importantly, our data suggest that prolonged pre-pregnancy-gestational undernutrition could have altered the normal fluctuations of endocannabinoid levels and thus, the establishment of functional circuitries

involved in metabolism, ultimately leading to metabolic abnormalities later in life, as proposed by Keimpema et al. (2013). Supporting this hypothesis, we have recently analyzed the expression of cannabinoid CB1 and CB2 receptors mRNA in the hypothalamus of adult offspring born from mothers exposed to pre- and gestational moderate caloric restriction and we have found a clear upregulation in the expression of both receptors, indicating long-term alterations in the offspring as result of maternal undernutrition (Ramírez-López et al., submitted).

Interestingly, although the levels of non-cannabinoid NAEs seem to be less influenced by diet (Hansen and Diep, 2009), we have found decreased levels of PEA in hypothalamus. PEA has been shown to exert anti-inflammatory (Hoareau and Roche, 2010) and antiobesity effects (Mattace Raso et al., 2014). Taken into account this evidence, PEA level deregulation in early life may predispose to diseases associated to inflammation, such as obesity and metabolic syndrome (Rana et al., 2007). Further research should be pursued to corroborate these possibilities.

We also found reductions in AEA levels and a strong tendency to decreased AA levels in hippocampus. It has been shown that circuits connecting hippocampus and hypothalamus are involved in the control of the hedonic aspects of eating (Petrovich, 2013) and that hippocampal endocannabinoid levels can be altered according to different types of diet (Rivera et al., 2012). For instance, decreased levels of hippocampal endocannabinoids have been reported after exposing young animals to prolonged starvation (Hanus et al., 2003). Moreover, we have recently reported decreased levels of hippocampal endocannabinoids after maternal exposure to a high-fat and low protein-containing diet (Ramírez-López et al., 2016). Taking into account that the endocannabinoids play an important role in the regulation of emotional processes and memory formation in this specific brain region (Lutz et al., 2015), these

findings raise the question of whether decreased hippocampal endocannabinoid levels in critical windows of development may lead to altered emotional responses later in life (Ramírez-López et al., 2016).

Finally, in the olfactory bulb, another brain structure involved in the regulation of metabolism and feeding behavior, we only found a tendency towards decreased AEA levels, similarly to that found in the hippocampus and hypothalamus. Although these modifications were subtle, they still could have led to alterations in metabolism and feeding behavior later in life, considering the role of endocannabinoid signaling in odor perception and food intake (Soria-Gómez et al., 2014). Future studies are necessary to confirm these speculations.

### **A Moderate Maternal Caloric Restriction During the Preconceptional/Pregnancy Period Influences Metabolic-Related Parameters in Offspring**

Although offspring were weaned on standard chow diet, male offspring from calorie-restricted dams started to gain more weight as compared to controls at the beginning of adulthood and exhibited overweight starting from the 15th PN week. Increased weight was accompanied by augmented abdominal adiposity, although caloric intake was not changed in these animals. These long-lasting effects suggest that altered endocannabinoid levels, and presumably signaling, might be associated with inadequate wiring, which could directly trigger a pathological state. This deregulation may also induce subtle alterations in neuronal connectivity of brain structures involved in metabolism, which would eventually increase the vulnerability to diseases later on in life, as proposed by the direct/double hit hypothesis (Keimpema et al., 2013).

Our findings are consistent with other studies showing similar alterations in offspring exposed to a maternal caloric restriction and weaned on a normocaloric diet (Desai et al., 2005; Breton et al., 2009; Suzuki et al., 2010; García et al., 2011; Lukaszewski et al., 2011). Moreover, these effects have been shown either in offspring that were underweight (Desai et al., 2005) or normoweight at birth (Palou et al., 2010). Interestingly, adult obesity in previously undernourished fetus has been associated to early catch-up growth (Eriksson et al., 1999; Desai et al., 2005). Although we do not show direct evidence of early catch-up growth in calorie-restricted offspring, the fact that they were born normoweight and displayed increased weight gain during the first days of life suggests that these animals may be underweight during the fetal period but may have recovered at the end of the nutritional insult (when dams were switched to normal diet). Therefore, normal weight at birth may result from an accelerated catch-up growth, as similarly reported in animal models of maternal caloric restriction (Desai et al., 2005; Yura et al., 2005; Suzuki et al., 2010).

On the other hand, obesity in offspring exposed to maternal undernutrition has been also associated to hyperphagia (Vickers et al., 2000; Desai et al., 2005; Breton et al., 2009; Palou et al., 2010). However, our animals did not display modifications in the caloric intake relative to body weight consistent with the evidence

that undernutrition in early life does not necessarily alter food intake (Yura et al., 2005; Sebert et al., 2009). Indeed, it has been reported that once offspring from animal models of maternal caloric restriction reach the same body weight as controls, their hyperphagic behavior ends (Lukaszewski et al., 2011). Under this framework, the increased body weight could be also explained by a reduction in energy expenditure linked to deregulation in endocannabinoid levels during early life, in accordance to the role of these bioactive lipids in food intake, energy balance and energy expenditure (Matias and Di Marzo, 2007; Bermudez-Silva et al., 2010).

To explain the increased adiposity found in the adult offspring from calorie-restricted dams, additional mechanisms have been proposed. For instance, inadequate nutritional conditions in early life induce upregulation of adipogenic signaling pathways, increased expression of genes involved in adipocyte differentiation (Guan et al., 2005), upregulation of lipogenic transcription factors (Desai et al., 2008) and alterations in sympathetic innervations of adipose tissue (García et al., 2011). Interestingly, the endocannabinoid system has been involved in adipogenesis and fat accumulation (Matias and Di Marzo, 2007). However, the role of the endocannabinoid system in perinatal programming has not been elucidated yet and, in the current study, we have not addressed the potential impact of maternal diet restriction on endocannabinoid signaling alterations in the periphery, such as liver, muscle or adipose tissue. However, recent preliminary data obtained using this model indicates changes in the expression of the enzymes controlling production and degradation of endocannabinoids in these peripheral tissues in adult offspring, suggesting that the observed alteration at birth might extend to the adulthood (Ramírez-López et al., submitted). Although we did not monitor the evolution of these changes, one may speculate that endocannabinoid level alterations at birth and/or alterations in peripheral tissues involved in energy expenditure could have contributed to the increased adiposity found in adulthood. Further investigation are required to address these possibilities.

### **A Moderate Maternal Caloric Restriction Increases the Propensity to Anxiety-Related Responses But Does Not Affect Locomotion and Food Preference in Offspring**

Because of the importance of the long-term consequences of maternal undernutrition, we also explored the behavioral phenotype of adult offspring born from calorie-restricted dams. We have observed enhanced anxiety-related responses in adolescence, as measured by the elevated plus maze test, as previously described in humans (Nomura et al., 2007) and in animal models of maternal caloric restriction in early pregnancy (Erhard et al., 2004; Levay et al., 2008). Although various mechanisms have been proposed regarding the altered emotional responses following prenatal undernutrition (i.e., dysfunctions in HPA and sympathetic adrenal (Levay et al., 2010), our observation of alterations in the endocannabinoid system



suggests its involvement given the predominant role played by this system in emotional control a prominent role in emotional control (Lutz, 2009; Lutz et al., 2015). In the present study, we found reduced endocannabinoid levels specifically in hypothalamus and hippocampus. Decreased levels of 2-AG in hippocampus have been associated to anxiety-related responses (Jenniches et al., 2016; Ramírez-López et al., 2016) and altered endocannabinoid signaling after cannabinoid agonist administration in early development leads to decreased emotional reactivity (Antonelli et al., 2005). Therefore, these data suggest that impairment in endocannabinoid signaling in the developing brain could lead to neurobehavioral alterations in the offspring. Nevertheless, further investigations must be pursued to establish whether decreased endocannabinoid levels at birth are correlated to the development of anxiety later in life.

## CONCLUSION

This is the first study to demonstrate that a moderate maternal calorie-restricted diet applied during the preconceptional and pregnancy period leads to altered endocannabinoid and NAE levels, and specifically, reduced AEA, 2-AG, AA levels in the hypothalamus and reduced AEA levels in the hippocampus. Additionally, although offspring were weaned on standard chow diet, the alterations in endocannabinoid levels may be correlated to overweight, abdominal adiposity and increased anxiety-related responses in adulthood. Therefore, these data suggest that the contribution of the endocannabinoid system in the early life programming after maternal exposure to undernutrition is relevant, especially considering that an inadequate endocannabinoid signaling could disrupt the circuitries involved in metabolism and emotional control.

## REFERENCES

- Akitake, Y., Katsuragi, S., Hosokawa, M., Mishima, K., Ikeda, T., Miyazato, M., et al. (2015). Moderate maternal food restriction in mice impairs physical growth, behavior and neurodevelopment of offspring. *Nutr. Res.* 35, 76–87. doi: 10.1016/j.nutres.2014.10.014
- Alén, F., Ramírez-López, M. T., Gómez de Heras, R., Rodríguez de Fonseca, F., and Orío, L. (2013). Cannabinoid receptors and cholecystokinin in feeding inhibition. *Vitam. Horm.* 92, 165–196. doi: 10.1016/B978-0-12-410473-0.00007-6
- Antonelli, T., Tomasini, M. C., Tattoli, M., Cassano, T., Tanganelli, S., Finetti, S., et al. (2005). Prenatal exposure to the CB1 receptor agonist WIN 55,212–2 causes learning disruption associated with impaired cortical NMDA receptor function and emotional reactivity changes in rat offspring. *Cereb. Cortex* 15, 2013–2020. doi: 10.1093/cercor/bhi076
- Baik, M., Rajasekar, P., Lee, M. S., Kim, J., Kwon, D., Kang, W., et al. (2014). An intrauterine catch-up growth regimen increases food intake and post-natal growth in rats. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 98, 1132–1142. doi: 10.1111/jpn.12170
- Barker, D. J. (2007). The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 261, 412–417. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x
- Barker, D. J. P., Hales, C. N., Fall, C. H. D., Osmond, C., Phipps, K., and Clark, P. M. S. (1993). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36, 62–67. doi: 10.1007/bf00399095
- Barker, D. J., and Osmond, C. (1988). Low birth weight and hypertension. *Br. Med. J.* 297, 134–135. doi: 10.1136/bmj.297.6641.134-b

Further investigations aimed at understanding how and why these alterations occur might be a useful strategy in the search of efficient therapies to address impaired programming.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MTR-L, BL, RGH and FRF conceptualized and designed the experimental approaches. MTR-L, MV, FA, MA, NB, RA, DO and LO did the animal experiments, including behavioral studies and sampling. MTR-L, LB, EL and CH did the endocannabinoid measurements. JD, JS, FA and FRF did statistical analysis and graphs. JS, FRF, BL and MTR-L wrote the draft of the manuscript that was revised by all authors.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad (PI13/0226 to FRF, CP12/03109 to JS and PSI-2012-35388 to RGH), Red de Trastornos Adictivos (RD12/0028/0001 to FRF), CIBERobn, Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía, UE/ERDF (PI45403, CTS-8221, CTS-433 to FRF), Consejería de Salud, Junta de Andalucía (SAS111224 to JS and FRF), and the German Research Foundation DFG (FOR926, project CP1 to BL). MTR-L has been funded by a FPU predoctoral fellowship of the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (AP-2009-0225); JS holds “Miguel Servet” research contract from the National System of Health, ISCIII (Grant No. CP12/03109). The authors also thank Claudia Schwitter for her help and support during lipid extraction and BCA analysis.

- Berger, A., Crozier, G., Bisogno, T., Cavaliere, P., Innis, S., and Di Marzo, V. (2001). Anandamide and diet: inclusion of dietary arachidonate and docosahexaenoate leads to increased brain levels of the corresponding N-acyl ethanolamines in piglets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 6402–6406. doi: 10.1073/pnas.101119098
- Bermudez-Silva, F., Viveros, M., McPartland, J., and Rodríguez de Fonseca, F. (2010). The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95, 375–382. doi: 10.1016/j.pbb.2010.03.012
- Bernard, C., Milh, M., Morozov, Y. M., Ben-Ari, Y., Freund, T. F., and Gozlan, H. (2005). Altering cannabinoid signaling during development disrupts neuronal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102, 9388–9393. doi: 10.1073/pnas.0409641102
- Berrendero, F., Sepe, N., Ramos, J. A., Di Marzo, V., and Fernández-Ruiz, J. J. (1999). Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse* 33, 181–191. doi: 10.1002/(sici)1098-2396(19990901)33:3<181::aid-syn3>3.0.co;2-r
- Bindila, L., and Lutz, B. (2016). Extraction and simultaneous quantification of endocannabinoids and endocannabinoid-like lipids in biological tissues. *Methods Mol. Biol.* 1412, 9–18. doi: 10.1007/978-1-4939-3539-0\_2
- Bouret, S. G., Draper, S. J., and Simerly, R. B. (2004). Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J. Neurosci.* 24, 2797–2805. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5369-03.2004

- Breton, C., Lukaszewski, M. A., Risold, P. Y., Enache, M., Guillemot, J., Rivière, G., et al. (2009). Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E462–E472. doi: 10.1152/ajpendo.90740.2008
- Burton, G. J., Watson, A. L., Hempstock, J., Skepper, J. N., and Jauniaux, E. (2002). Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 2954–2959. doi: 10.1210/jc.87.6.2954
- Coupé, B., Dutriez-Casteloot, I., Breton, C., Lefevre, F., Mairesse, J., Dickes-Coopman, A., et al. (2009). Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. *J. Neuroendocrinol.* 21, 40–48. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01806.x
- de Salas-Quiroga, A., Díaz-Alonso, J., García-Rincón, D., Remmers, F., Vega, D., Gómez-Cañas, M., et al. (2015). Prenatal exposure to cannabinoids evokes long-lasting functional alterations by targeting CB1 receptors on developing cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 112, 13693–13698. doi: 10.1073/pnas.1514962112
- Desai, M., Gayle, D., Babu, J., and Ross, M. G. (2005). Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, R91–R96. doi: 10.1152/ajpregu.00340.2004
- Desai, M., Guang, H., Ferelli, M., Kallichanda, N., and Lane, R. H. (2008). Programmed upregulation of adipogenic transcription factors in intrauterine growth-restricted offspring. *Reprod. Sci.* 15, 785–796. doi: 10.1177/1933719108318597
- Di Marzo, V., Goparaju, S. K., Wang, L., Liu, J., Bátka, S., Jári, Z., et al. (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410, 822–825. doi: 10.1038/35071088
- Edwards, L. J., and McMillen, L. C. (2002). Periconceptional nutrition programs development of the cardiovascular system in the fetal sheep. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283, R669–R679. doi: 10.1152/ajpregu.00736.2001
- Erhard, H. W., Boissy, A., Rae, M. T., and Rhind, S. M. (2004). Effects of prenatal undernutrition on emotional reactivity and cognitive flexibility in adult sheep. *Behav. Brain Res.* 151, 25–35. doi: 10.1016/j.bbr.2003.08.003
- Eriksson, J. G., Forsen, T., Tuomilehto, J., Winter, P. D., Osmond, C., and Barker, D. J. (1999). Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *Br. Med. J.* 318, 427–431. doi: 10.1136/bmj.318.7181.427
- Fernández-Gonzalez, R., Moreira, P., Bilbao, A., Jiménez, A., Pérez-Crespo, M., Ramírez, M. A., et al. (2004). Long-term effect of *in vitro* culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 5880–5885. doi: 10.1073/pnas.0308560101
- García, A. P., Palou, M., Sánchez, J., Priego, T., Palou, A., and Picó, C. (2011). Moderate caloric restriction during gestation in rats alters adipose tissue sympathetic innervation and later adiposity in offspring. *PLoS One* 6:e17313. doi: 10.1371/journal.pone.0017313
- Gould Rothberg, B. E., Magriples, U., Kershaw, T. S., Rising, S. S., and Ickovics, J. R. (2011). Gestational weight gain and subsequent postpartum weight loss among young, low-income, ethnic minority women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 204, 52.e1–52.e11. doi: 10.1016/j.ajog.2010.08.028
- Guan, H., Arany, E., van Beek, J. P., Chamson-Reig, A., Thyssen, S., Hill, D. J., et al. (2005). Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E663–E673. doi: 10.1152/ajpendo.00461.2004
- Hales, C. N., Barker, D. J., Clark, P. M., Cox, L. J., Fall, C., Osmond, C., et al. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 303, 1019–1022. doi: 10.1136/bmj.303.6809.1019
- Hansen, H. S., and Artmann, A. (2008). Endocannabinoids and nutrition. *J. Neuroendocrinol.* 1, 94–99. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01687.x
- Hansen, H. S., and Diep, T. A. (2009). N-acyl ethanolamines, anandamide and food intake. *Biochem. Pharmacol.* 78, 553–560. doi: 10.1016/j.bcp.2009.04.024
- Hanus, L., Avraham, Y., Ben-Shushan, D., Zolotarev, O., Berry, E. M., and Mechoulam, R. (2003). Short-term fasting and prolonged semistarvation have opposite effects on 2-AG levels in mouse brain. *Brain Res.* 983, 144–151. doi: 10.1016/s0006-8993(03)03046-4
- Hoareau, L., and Roche, R. (2010). Palmitoylethanolamide, adipocytes and obesity-related inflammatory states. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 7, e205–e212. doi: 10.1016/j.ddmec.2011.01.002
- Institute of Medicine. (2009). *Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines*. Washington, DC: National Academies Press.
- Jenniches, I., Ternes, S., Albayram, O., Otte, D. M., Bach, K., Bindila, L., et al. (2016). Anxiety, stress, and fear response in mice with reduced endocannabinoid levels. *Biol. Psychiatry* 79, 858–868. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.03.033
- Kapadia, M. Z., Park, C. K., Beyene, J., Giglia, L., Maxwell, C., and McDonald, S. D. (2015). Can we safely recommend gestational weight gain below the 2009 guidelines in obese women? A systematic review and meta-analysis. *Obes. Rev.* 16, 189–206. doi: 10.1111/obr.12238
- Keimpema, E., Calvigioni, D., and Harkany, T. (2013). Endocannabinoid signals in the developmental programming of delayed-onset neuropsychiatric and metabolic illnesses. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1569–1576. doi: 10.1042/BST20130117
- Keimpema, E., Höckfelt, T., Harkany, T., and Doherty, P. (2014). The molecular interplay between endocannabinoid and neurotrophin signals in the nervous system and beyond. *Eur. J. Neurosci.* 39, 334–343. doi: 10.1111/ejn.12431
- Klingerman, C. M., Williams, W. P. III, Simberlund, J., Brahme, N., Prasad, A., Schneider, J. E., et al. (2011). Food restriction-induced changes in gonadotropin-inhibiting hormone cells are associated with changes in sexual motivation and food hoarding, but not sexual performance and food intake. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 2:101. doi: 10.3389/fendo.2011.00101
- Levay, E. A., Paolini, A. G., Govic, A., Hazi, A., Penman, J., and Kent, S. (2008). Anxiety-like behaviour in adult rats perinatally exposed to maternal calorie restriction. *Behav. Brain Res.* 191, 164–172. doi: 10.1016/j.bbr.2008.03.021
- Levay, E. A., Paolini, A. G., Govic, A., Hazi, A., Penman, J., and Kent, S. (2010). HPA and sympathoadrenal activity of adult rats perinatally exposed to maternal mild calorie restriction. *Behav. Brain Res.* 208, 202–208. doi: 10.1016/j.bbr.2009.11.033
- Linna, M. S., Raevuori, A., Haukka, J., Suvisaari, J. M., Suokas, J. T., and Gissler, M. (2014). Pregnancy, obstetric and perinatal health outcomes in eating disorders. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 211, 392.e1–392.e8. doi: 10.1016/j.ajog.2014.03.067
- Lucas, A. (1991). Programming by early nutrition in man. *Ciba Found. Symp.* 156, 38–50; discussion 50–55. doi: 10.1002/9780470514047.ch4
- Lukaszewski, M. A., Mayeur, S., Pajardy, I., Delahaye, F., Dutriez-Casteloot, I., Montel, V., et al. (2011). Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301, E548–E559. doi: 10.1152/ajpendo.00011.2011
- Lussana, F., Painter, R. C., Ocke, M. C., Buller, H. R., Bossuyt, P. M., and Roseboom, T. J. (2008). Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 1648–1652. doi: 10.3945/ajcn.2008.26140
- Lutz, B. (2009). Endocannabinoid signals in the control of emotion. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 46–52. doi: 10.1016/j.coph.2008.12.001
- Lutz, B., Marsicano, G., Maldonado, R., and Hillard, C. J. (2015). The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 705–718. doi: 10.1038/nrn4036
- Maccarrone, M., Guzmán, M., Mackie, K., Doherty, P., and Harkany, T. (2014). Programming of neural cells by (endo)cannabinoids: from physiological rules to emerging therapies. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 786–801. doi: 10.1038/nrn3846
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., and Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* 62, 609–614. doi: 10.1590/s1519-69842002000400008
- Matias, I., and Di Marzo, V. (2007). Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 27–37. doi: 10.1016/j.tem.2006.11.006
- Matias, I., Léonhardt, M., Lesage, J., De Petrocellis, L., Dupouy, J. P., Vieau, D., et al. (2003). Effect of maternal under-nutrition on pup body weight and hypothalamic endocannabinoid levels. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 382–389. doi: 10.1007/s000180300031
- Mattace-Raso, G., Santoro, A., Russo, R., Simeoli, R., Paciello, O., Di Carlo, C., et al. (2014). Palmitoylethanolamide prevents metabolic alterations and restores leptin sensitivity in ovariectomized rats. *Endocrinology* 155, 1291–1301. doi: 10.1210/en.2013-1823

- McMillen, I. C., Schwartz, J., Coulter, C. L., and Edwards, L. J. (2004). Early embryonic environment, the fetal pituitary-adrenal axis and the timing of parturition. *Endocr. Res.* 30, 845–850. doi: 10.1081/erc-200044106
- Micali, N., Treasure, J., and Simonoff, E. (2007). Eating disorders symptoms in pregnancy: a longitudinal study of women with recent and past eating disorders and obesity. *J. Psychosom. Res.* 63, 297–303. doi: 10.1016/j.jpsychores.2007.05.003
- Moreno, M., Escuredo, L., Muñoz, R., Rodríguez de Fonseca, F., and Navarro, M. (2005). Long-term behavioural and neuroendocrine effects of perinatal activation or blockade of CB1 cannabinoid receptors. *Behav. Pharmacol.* 16, 423–430. doi: 10.1097/00008877-200509000-00015
- Nomura, Y., Wickramaratne, P. J., Pilowsky, D. J., Newcorn, J. H., Bruder-Costello, B., Davey, C., et al. (2007). Low birth weight and risk of affective disorders and selected medical illness in offspring at high and low risk for depression. *Compr. Psychiatry* 48, 470–478. doi: 10.1016/j.comppsy.2007.04.005
- Palou, M., Priego, T., Sánchez, J., Palou, A., and Picó, C. (2010). Sexual dimorphism in the lasting effects of moderate caloric restriction during gestation on energy homeostasis in rats is related with fetal programming of insulin and leptin resistance. *Nutr. Metab. (Lond)* 7:69. doi: 10.1186/1743-7075-7-69
- Petrovich, G. D. (2013). Forebrain networks and the control of feeding by environmental learned cues. *Physiol. Behav.* 121, 10–18. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.03.024
- Poore, K. R., Boullin, J. P., Cleal, J. K., Newman, J. P., Noakes, D. E., Hanson, M. A., et al. (2010). Sex- and age-specific effects of nutrition in early gestation and early postnatal life on hypothalamo-pituitary-adrenal axis and sympathoadrenal function in adult sheep. *J. Physiol.* 588, 2219–2237. doi: 10.1113/jphysiol.2010.187682
- Ramírez-López, M. T., Vázquez, M., Bindila, L., Lomazzo, E., Hofmann, C., Blanco, R. N., et al. (2016). Exposure to a highly caloric palatable diet during pregestational and gestational periods affects hypothalamic and hippocampal endocannabinoid levels at birth and induces adiposity and anxiety-like behaviors in male rat offspring. *Front. Behav. Neurosci.* 9:339. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00339
- Rana, J. S., Nieuwdorp, M., Jukema, J. W., and Kastelein, J. J. P. (2007). Cardiovascular metabolic syndrome—an interplay of, obesity, inflammation, diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Obes. Metab.* 9, 218–232. doi: 10.1111/j.1463-1326.2006.00594.x
- Raychaudhuri, N., Raychaudhuri, S., Thamocharan, M., and Devaskar, S. U. (2008). Histone code modifications repress glucose transporter 4 expression in the intrauterine growth-restricted offspring. *J. Biol. Chem.* 283, 13611–13626. doi: 10.1074/jbc.M800128200
- Rivera, P., Luque-Rojas, M. J., Pastor, A., Blanco, E., Pavón, F. J., Serrano, A., et al. (2012). Diet-dependent modulation of hippocampal expression of endocannabinoid signaling-related proteins in cannabinoid antagonist-treated obese rats. *Eur. J. Neurosci.* 37, 105–117. doi: 10.1111/ejn.12012
- Rodríguez de Fonseca, F., Cebalra, M., Fernández-Ruiz, J. J., Navarro, M., and Ramos, J. A. (1991). Effects of pre- and perinatal exposure to hashish extracts on the ontogeny of brain dopaminergic neurons. *Neuroscience* 43, 713–723. doi: 10.1016/0306-4522(91)90329-m
- Roseboom, T., de Rooij, S., and Painter, R. (2006). The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum. Dev.* 82, 485–491. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2006.07.001
- Sebert, S. P., Hyatt, M. A., Chan, L. L., Patel, N., Bell, R. C., Keisler, D., et al. (2009). Maternal nutrient restriction between early and midgestation and its impact upon appetite regulation after juvenile obesity. *Endocrinology* 150, 634–641. doi: 10.1210/en.2008-0542
- Sebert, S., Sharkey, D., Budge, H., and Symonds, M. E. (2011). The early programming of metabolic health: is epigenetic setting the missing link? *Am. J. Clin. Nutr.* 94, 1953S–1958S. doi: 10.3945/ajcn.110.001040
- Serrano, A., Decara, J. M., Fernández-González, R., López-Cardona, A. P., Pavón, F. J., Orío, L., et al. (2014). Hyperplastic obesity and liver steatosis as long-term consequences of suboptimal *in vitro* culture of mouse embryos. *Biol. Reprod.* 91:30. doi: 10.1095/biolreprod.114.117879
- Soria-Gómez, E., Bellocchio, L., Reguero, L., Lepousez, G., Martin, C., Bendahmane, M., et al. (2014). The endocannabinoid system controls food intake via olfactory processes. *Nat. Neurosci.* 17, 407–415. doi: 10.1038/nn.3647
- Suzuki, M., Shibamura, M., and Kimura, S. (2010). Effect of severe maternal dietary restriction on growth and intra-abdominal adipose tissue weights in offspring rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 56, 293–298. doi: 10.3177/jnsv.56.293
- Terry, K. K., Chatman, L. A., Foley, G. L., Kadyszewski, E., Fleeman, T. L., Hurtt, M. E., et al. (2005). Effects of feed restriction on fertility in female rats. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 74, 431–441. doi: 10.1002/bdrb.20060
- Treasure, J. L., and Russell, G. F. (1988). Intrauterine growth and neonatal weight gain in babies of women with anorexia nervosa. *Br. Med. J.* 296:1038. doi: 10.1136/bmj.296.6628.1038
- Vickers, M. H., Breier, B. H., Cutfield, W. S., Hofman, P. L., and Gluckman, P. D. (2000). Fetal origins of hyperphagia, obesity and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, E83–E87.
- Wenzel, D., Matthey, M., Bindila, L., Lerner, R., Lutz, B., Zimmer, A., et al. (2013). Endocannabinoid anandamide mediates hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 110, 18710–18715. doi: 10.1073/pnas.1308130110
- World Health Organization. (2014). *Global Status Report of Noncommunicable Diseases 2014*. Geneva: WHO Press, World Health Organization.
- Yura, S., Itoh, H., Sagawa, N., Yamamoto, H., Masuzaki, H., Nakao, K., et al. (2005). Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab.* 1, 371–378. doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.005
- Zhang, S., Morrison, J. L., Gill, A., Rattanaray, L., MacLaughlin, S. M., Kleemann, D., et al. (2013). Maternal dietary restriction during the periconceptual period in normal-weight or obese ewes results in adrenocortical hypertrophy, an up-regulation of the JAK/STAT and down-regulation of the IGF1R signaling pathways in the adrenal of the postnatal lamb. *Endocrinology* 154, 4650–4662. doi: 10.1210/en.2013-1414

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

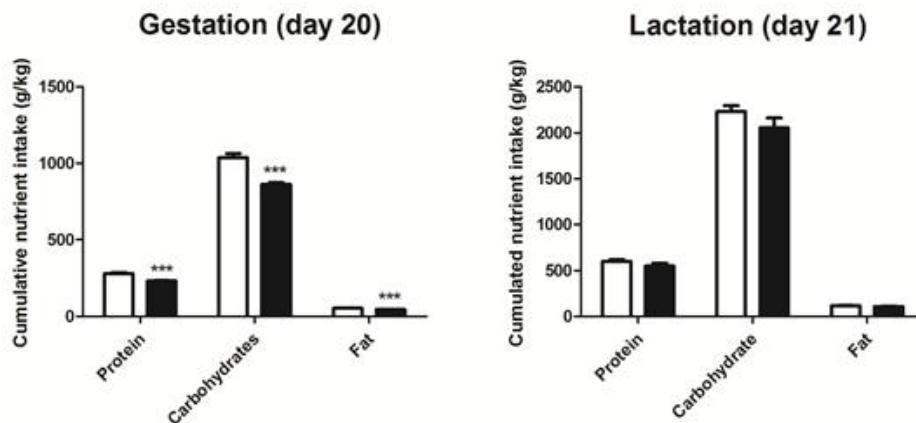
Copyright © 2016 Ramírez-López, Vázquez, Bindila, Lomazzo, Hofmann, Blanco, Alén, Antón, Decara, Arco, Ouro, Orío, Suárez, Lutz, Gómez de Heras and Rodríguez de Fonseca. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## 1.1.2 Datos complementarios al artículo 2

En este apartado se exponen algunos resultados que no han sido incluidos en el **artículo 2**, pero que resultan importantes porque permiten comparar los resultados con el modelo de dieta materna hipercalórica y/o abordan parte de los objetivos específicos planteados, como por ejemplo la evaluación del dimorfismo sexual.

### 1.1.2.1 Ingesta nutricional durante la gestación y lactancia

Hasta el día 20 de la gestación, las ratas madre asignadas a la dieta de restricción tenían una ingesta acumulada significativamente menor de proteínas ( $t=7.467$ ,  $p<0.001$ ), de carbohidratos ( $t=7.467$ ,  $p<0.001$ ) y grasas ( $t=7.767$ ,  $p<0.001$ ). En el periodo de lactancia no se encontraron diferencias (*figura complementaria 1*).



*Figura complementaria 1.* Ingesta nutricional durante la gestación y lactancia en las madres expuestas a restricción calórica. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Las barras blancas se refieren al grupo control, mientras que las barras negras representan al grupo de restricción tipo 1.  
\*\*\*:  $p<0.001$ .

### 1.1.2.2 Impacto de la restricción calórica en la adiposidad materna al destete

Al final de la lactancia las ratas madre fueron sacrificadas y se estimó la adiposidad abdominal. La prueba t de Student no encontró diferencias significativas entre los grupos (datos no mostrados).

### 1.1.2.3 Efecto de la dieta materna restringida en las respuestas conductuales de la descendencia hembra

En este apartado especifican los resultados de igual modo que se han mostrado en la descendencia macho del **artículo 2**.

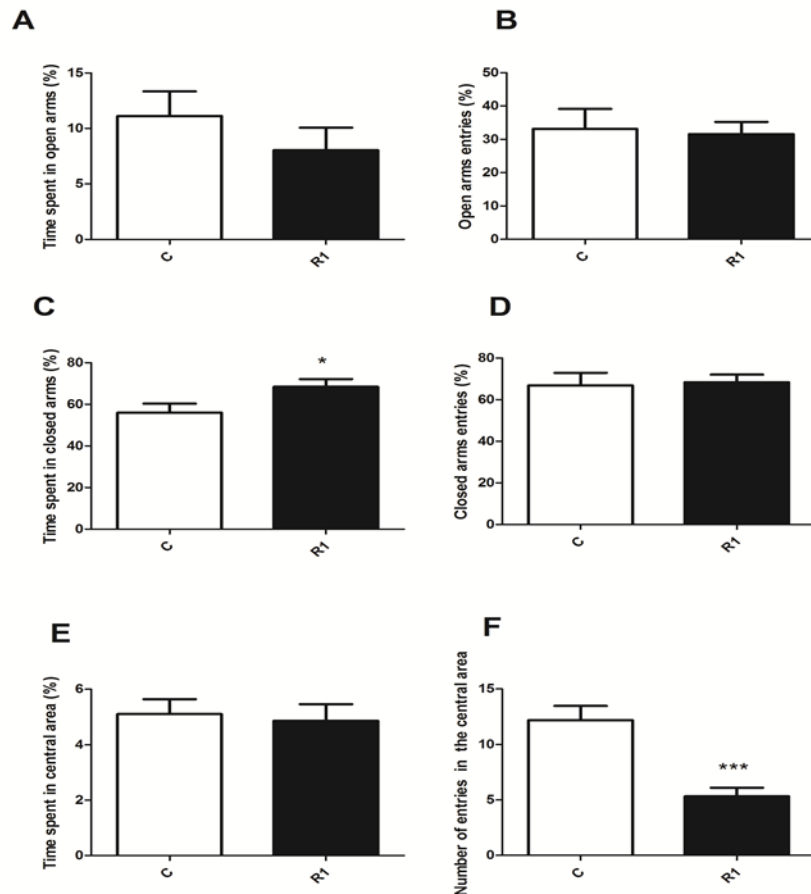
#### 1.1.2.3.1 Evaluación de las conductas relacionadas con la ansiedad en la descendencia hembra

Para evaluar las respuestas relacionadas con la ansiedad se empleó el laberinto en cruz elevado (*Elevated plus maze*) y el test de campo abierto (*Open field test*). Los test fueron realizados en el periodo adolescente. Se encontró que las hembras expuestas a una dieta materna restringida (R1) presentaban más respuestas relacionadas con la ansiedad que los controles, pasando más tiempo en los brazos cerrados del laberinto en cruz elevado ( $t=2.271, P<0.05$ ) (**figura complementaria 2B**) y entrando menos veces a la zona central del campo abierto ( $t=2.483, p<0.05$ ) (**figura complementaria 2F**). A diferencia de los machos expuestos a la misma dieta (**artículo 2, figura 8**), no presentaban alteraciones en el tiempo que permanecían en los brazos abiertos, ni permanecían menos tiempo en la zona central del campo abierto (**figuras complementarias 2A y 2E**). En cambio, sí entraban menos en la zona central del campo abierto (**figura complementaria 2F**). Estos datos evidencian una conducta ligeramente más ansiosa en las hembras expuestas a la dieta restringida en el periodo perinatal. Sin embargo, ese sutil fenotipo ansioso mostrado por las mismas, resultó menos intenso que el mostrado por los machos expuestos a la misma dieta (**artículo 2, figura 8**), dado el menor número de respuestas relacionadas con la ansiedad, exhibidas por éstas.

#### 1.1.2.3.2 Evaluación de la conducta locomotora en la descendencia hembra

La respuesta locomotora se estimó evaluando la distancia recorrida y velocidad media en el test de campo abierto en el periodo adolescente. Aunque en la variable velocidad media las hembras expuestas a restricción desde el periodo pregestacional tendían a ser más veloces ( $t=1.81, p=0.07$ ), el test de la t de Student no mostró diferencias significativas entre los

grupos en la distancia recorrida. Estos datos son similares a los encontrados en la descendencia macho (**artículo 2**) e indican que en general la respuesta locomotora no estaba afectada por la dieta perinatal (datos no mostrados).



**Figura complementaria 2.** Conductas relacionadas con la ansiedad en la descendencia hembra expuesta perinatalmente a dieta restringida. Se evaluaron a través del test del laberinto en cruz elevado y del test de campo abierto (*open field*) en el periodo adolescente. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Actividad en el laberinto en cruz elevado (A-D). Respuestas en el test de campo abierto (E-F). Las barras blancas se refieren a los descendientes expuestos a dieta control (C), mientras que las barras negras indican la actividad de los animales expuestos a restricción tipo 1 (R1). \*:  $p < 0.05$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

## 1.2 Efecto de la dieta materna restringida durante el periodo preconcepcional y gestacional: Impacto en el sistema endocannabinoide de la descendencia en la etapa adulta.

### 1.2.1 Artículo 3

*Long-term effects of prenatal exposure to undernutrition on cannabinoid receptor-related behaviors: Sex and tissue-specific alterations in the mRNA expression of cannabinoid receptors and lipid metabolic regulators*

En este artículo se analizan los efectos a largo plazo de la dieta materna restringida en ambos sexos en conductas relacionadas con el sistema endocannabinoide, metabolismo así como la expresión de genes del sistema endocannabinoide y otros genes involucrados en el metabolismo lipídico. Específicamente, se estudian los efectos de la dieta materna y del sexo en los parámetros de crecimiento e ingesta calórica durante todo el periodo de estudio. Se evalúan del mismo modo también las diferencias en la conducta de la ingesta y preferencias por comidas a través del test de ingesta compulsiva, analizando además la respuesta diferencial la administración aguda del antagonista cannabinoide AM251. En la etapa adulta se analizan la adiposidad perirrenal y perigonadal, los metabolitos plasmáticos junto con la leptinemia. Por primera vez, se estudia el impacto de la dieta materna en la expresión de distintos componentes del sistema endocannabinoide y otros genes relacionados con el metabolismo en hipotálamo, hígado y tejido adiposo en la etapa adulta. Los resultados enfatizan que la exposición a una dieta materna restringida altera los parámetros de crecimiento, incrementa el riesgo de padecer características del síndrome metabólico en la etapa adulta, provocando sutiles diferencias en la conducta de la ingesta. Estas alteraciones fenotípicas se asocian a alteraciones en la expresión de genes del sistema endocannabinoide y genes relacionados con el metabolismo, que además se expresan de forma diferente en función del sexo.



# Long-Term Effects of Prenatal Exposure to Undernutrition on Cannabinoid Receptor-Related Behaviors: Sex and Tissue-Specific Alterations in the mRNA Expression of Cannabinoid Receptors and Lipid Metabolic Regulators

María T. Ramírez-López<sup>1,2</sup>, Rocío Arco<sup>3</sup>, Juan Decara<sup>3</sup>, Mariam Vázquez<sup>1,3</sup>,  
Patricia Rivera<sup>3</sup>, Rosario Noemí Blanco<sup>1</sup>, Francisco Alén<sup>1,3</sup>, Raquel Gómez de Heras<sup>1</sup>,  
Juan Suárez<sup>3,4\*</sup> and Fernando Rodríguez de Fonseca<sup>1,3\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Nuno Sousa,  
University of Minho, Portugal

### Reviewed by:

Eric Murillo-Rodríguez,  
Anahuac Mayab University, Mexico  
Liana Fattore,  
National Research Council, Italy

### \*Correspondence:

Juan Suárez  
juan.suarez@ibima.eu  
Fernando Rodríguez de Fonseca  
fernando.rodriguez@ibima.eu

Received: 03 October 2016

Accepted: 12 December 2016

Published: 27 December 2016

### Citation:

Ramírez-López MT, Arco R, Decara J,  
Vázquez M, Rivera P, Blanco RN,  
Alén F, Gómez de Heras R, Suárez J  
and Rodríguez de Fonseca F (2016)  
Long-Term Effects of Prenatal  
Exposure to Undernutrition on  
Cannabinoid Receptor-Related  
Behaviors: Sex and Tissue-Specific  
Alterations in the mRNA Expression of  
Cannabinoid Receptors and Lipid  
Metabolic Regulators.  
Front. Behav. Neurosci. 10:241.  
doi: 10.3389/fnbeh.2016.00241

<sup>1</sup>Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, <sup>2</sup>Hospital Universitario de Getafe, Madrid, Spain, <sup>3</sup>Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga, Universidad de Málaga, Málaga, Spain, <sup>4</sup>Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

Maternal malnutrition causes long-lasting alterations in feeding behavior and energy homeostasis in offspring. It is still unknown whether both, the endocannabinoid (eCB) machinery and the lipid metabolism are implicated in long-term adaptive responses to fetal reprogramming caused by maternal undernutrition. We investigated the long-term effects of maternal exposure to a 20% standard diet restriction during pre-conceptual and gestational periods on the metabolically-relevant tissues hypothalamus, liver, and perirenal fat (PAT) of male and female offspring at adulthood. The adult male offspring from calorie-restricted dams (RC males) exhibited a differential response to the CB1 antagonist AM251 in a chocolate preference test as well as increased body weight, perirenal adiposity, and plasma levels of triglycerides, LDL, VLDL, bilirubin, and leptin. The gene expression of the cannabinoid receptors *Cnr1* and *Cnr2* was increased in RC male hypothalamus, but a down-expression of most eCBs-metabolizing enzymes (*Faah*, *Dag1α*, *Dag1β*, *Mgll*) and several key regulators of fatty-acid  $\beta$ -oxidation (*Cpt1b*, *Acox1*), mitochondrial respiration (*Cox4i1*), and lipid flux (*Pparγ*) was found in their PAT. The female offspring from calorie-restricted dams exhibited higher plasma levels of LDL and glucose as well as a reduction in chocolate and caloric intake at post-weaning periods in the feeding tests. Their liver showed a decreased gene expression of *Cnr1*, *Pparα*, *Pparγ*, the eCBs-degrading enzymes *Faah* and *Mgll*, the *de novo* lipogenic enzymes *Acaca* and *Fasn*, and the liver-specific cholesterol biosynthesis regulators *Insig1* and



*Hmgcr*. Our results suggest that the long-lasting adaptive responses to maternal caloric restriction affected cannabinoid-regulated mechanisms involved in feeding behavior, adipose  $\beta$ -oxidation, and hepatic lipid and cholesterol biosynthesis in a sex-dependent manner.

**Keywords:** maternal diet, CB1 receptor,  $\beta$ -oxidation, lipoproteins, lipogenesis, hypothalamus, liver, adipose tissue

## INTRODUCTION

Although, overnutrition is an important life style factor for the development of metabolic syndrome, obesity, cardiovascular disease and diabetes mellitus (Alberti et al., 2009), maternal undernutrition resulting in early life nutritional unbalance can be also related to the onset of long-term metabolic alterations observed later in life. This process has been called nutritional programming (Lucas, 1991; Hales and Barker, 2001; Gluckman and Hanson, 2004; Barker, 2007; Vaag et al., 2012). Importantly, this hypothesis supports that fetal undernutrition can represent the origin of cardiovascular disease, non-insulin-dependent diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia at adulthood (Barker and Osmond, 1988; Barker et al., 1989, 1993).

The epidemiological data from the Dutch Famine have showed that people whose mothers were exposed to undernutrition in early gestation developed more metabolic abnormalities than people exposed in other pregnancy stages (Roseboom et al., 2006). Currently, maternal undernutrition is a problem not exclusive of developing countries. The pressure to thinness in western societies associated to a higher prevalence of women with a past of eating disorders or a worry in excess about body changing during pregnancy and postpartum have raised the risk for giving birth underweight babies (Easter et al., 2013; Linna et al., 2014). However, we should not discard a predictive marker of impaired fetal nutrition in those cases with absence of low birth weight.

Experiments with animals models have succeeded in simulate metabolic alterations of undernutrition during gestational periods in humans, particularly by the implementation of a moderate or severe calorie restricted diets (Desai et al., 2005; García et al., 2010; Palou et al., 2010; Suzuki et al., 2010; Lukaszewski et al., 2011). Consequently, the exposure to a moderate or severe restricted diet during pregnancy has been associated to features of metabolic syndrome in adult offspring such as higher adiposity (Yura et al., 2005; Suzuki et al., 2010; Lukaszewski et al., 2011), alterations in glucose metabolism (Jimenez-Chillaron et al., 2005; Breton et al., 2009; Theys et al., 2011), or alterations in the lipid plasmatic profile (Desai et al., 2005, 2007a; Palou et al., 2010, 2012). Moreover, these metabolic alterations after a maternal calorie restricted diet have been found associated to abnormalities in feeding behavior such as hyperphagia (Vickers et al., 2000; Breton et al., 2009; Manuel-Apolinar et al., 2014) or high preference for high-fat diet (Palou et al., 2010; Lukaszewski et al., 2011). Some studies have also noticed that the metabolic profile exhibited by offspring depends on the sex (Desai et al., 2007a; Palou et al., 2010; Suzuki et al., 2010).

Several biologic mechanisms underlying the nutritional programming, which become altered after the exposure to a maternal restricted diet during pregnancy, have been identified. They include epigenetic regulation (Nijland et al., 2010; Martinez et al., 2014), leptin signaling (Yura et al., 2005; Palou et al., 2010), hypothalamic development (Sebert et al., 2009; García et al., 2010), and dopaminergic and serotonergic signaling systems (Manuel-Apolinar et al., 2014). Interestingly, recent studies have documented epigenetic modifications or affectation of adrenocortical growth in offspring after maternal dietary restriction around the time of conception (Nicholas et al., 2013; Zhang et al., 2013), pointing out the importance of the periconceptual window in the metabolic programming.

The endocannabinoid system (ECS) is also implicated in metabolic and behavioral mechanisms involved in fetal programming such as leptin signaling (Di Marzo et al., 2001) or dopaminergic system (Melis et al., 2004). The ECS keeps a homeostatic role in regulating energy balance and food intake (Cristino et al., 2014), and its overactivation, mainly via CB1 receptors, favors the energy accumulation, increases the appetite for highly palatable foods, decreases the satiety and reduces the energy expenditure. Long-term effects of ECS activation could finally increase the risk from suffering metabolic diseases that lead to obesity and metabolic syndrome (Tibirica, 2010; Cristino et al., 2014). Additionally, it has been revealed that some ECS components are sensible to dietary conditions. As the main endogenous agonists (anandamide and 2-arachidonoyl glycerol) of the cannabinoid receptors CB1 and CB2 are derivatives of fatty acids, it has been demonstrated that the lipid profile of the diet could modify the endocannabinoid levels (Artmann et al., 2008) in some tissues, including the early developing brain (Berger et al., 2001). Consequently, the cannabinoid receptor activity may be modified. Furthermore, the gene expression of the ECS components could be modified after the exposure to different dietary conditions (Bello et al., 2012). Taking together, these data suggest that the ECS could play a putative role in nutritional programming and hence in the early origin of metabolic diseases.

Regarding the potential relation between ECS and fetal undernutrition, a few studies have demonstrated that the maternal exposure to a calorie-restricted diet during pregnancy and/or lactation could decrease the hypothalamic endocannabinoids and/or acylethanolamines in offspring (Matias et al., 2003; Ramírez-López et al., 2016). However, it is unknown whether changes in nutritional programming by maternal diet restriction during fetal development could modify the expression of ECS components later in life and lead to long-lasting impact on energy metabolism and feeding behavior.

Based on these considerations, we aim to focus on the long-term effects on cannabinoid-related behaviors (i.e., cannabinoid receptor antagonist-induced suppression of feeding), and effects on lipid-related metabolic pathways of a maternal exposure to a moderate caloric restriction during the preconceptional and gestational period. Particularly, we evaluated the gene expression of relevant components of the endocannabinoid system, and key enzymes and regulators of the lipid and cholesterol metabolism in metabolically relevant tissues, such as the hypothalamus, the liver, and the perirenal adipose tissue (PAT), of male and female adult offspring. Additionally, it was assessed the spontaneous and compulsive feeding behavior, growing parameters, leptin, plasma metabolites, and adiposity after weaning (adolescence and adulthood). We hypothesize that the maternal exposure to a moderate calorie-restricted diet could alter the energy homeostasis regulated by the ECS and could re-program fatty-acid metabolism later in life in a sex-specific manner. We also proposed that these putative alterations could increase the vulnerability to develop metabolic diseases in adulthood.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics Statement

Experimental procedures with animals were carried out following with the recommendations of the European Communities directive 2010/63/EU and Spanish legislation (Real Decreto 53/2013, BOE 34/11370-11421, 2013) regulating the care and use of laboratory animals. The protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the Complutense University of Madrid.

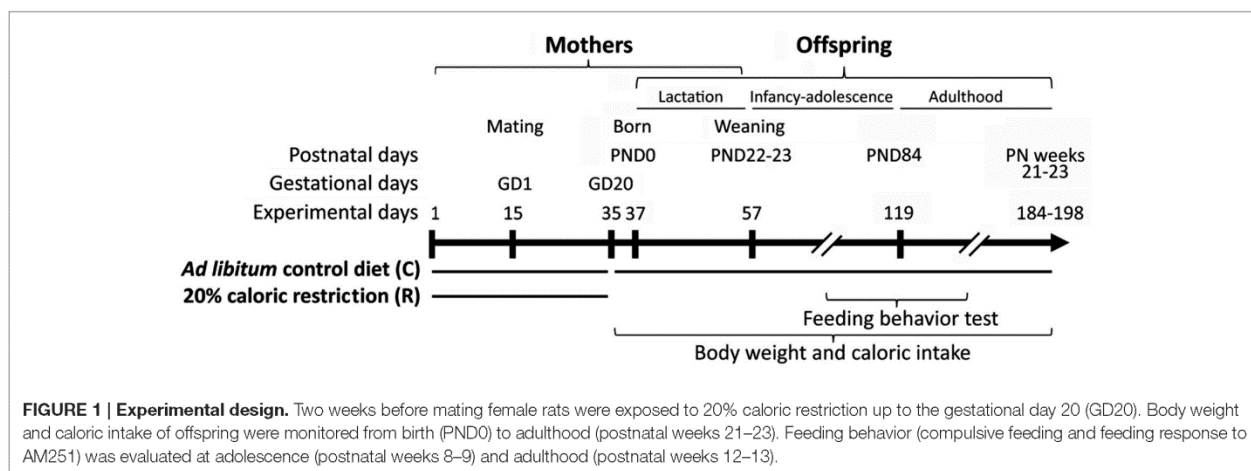
### Animals, Housing, Mating, and Feeding

Adolescent female Wistar rats (Harlan, Barcelona, Spain) weighing  $191.7 \pm 2.6$  g were individually housed in standard cages and maintained in controlled room conditions at  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  room temperature,  $40 \pm 5\%$  relative humidity and a 12-h light-dark cycle (lights off 8:00 p. m.). Animals were handled and allowed to acclimate for at least 4 weeks before the diet assignment. Then, 2 weeks before mating (Figure 1), animals

were weighed (average weight  $240.7 \pm 3.4$  g) and randomly exposed to an *ad libitum* access of a standard chow (control group;  $n = 9$ ) or a restricted access of the same standard chow (caloric restriction group;  $n = 15$ ). The females with caloric restriction were fed with a daily amount of food corresponding to the 80% of the calories that the control rats were fed in the previous day of the experiment, according to the body weight (20% of caloric restriction). The standard chow (Standard Chow SAFE A04, Panlab, Barcelona, Spain) contained 16.1% of protein, 60% carbohydrate, 3.1% fat, 4% fiber, and 0.0025% sodium, resulting in a 2.9 kcal/g as energy.

After 2 weeks of feeding (pregestational period), adult females (4 month old) were allowed to mate with male rats of the same strain weighting  $484.5 \pm 7.96$  (Figure 1). The presence of plug or spermatozoa in the vaginal smear confirmed the successful mating, and this was designated as gestational day 0 (GD 0). Female rats were maintained on the same diet paradigm as in the pregestational period up to the gestational day 20 (GD 20). Thus, the caloric restriction finished at GD 20 (2 days before birth), and all dams and their offspring were fed *ad libitum* with the standard chow along the remaining experimental periods (lactation and postweaning periods). The day of birth was defined as postnatal day 0 (PND 0). Within the 14 h after birth, pups were weighed, sexed, and culled to comprise up to 8 pups per mother (4 males and 4 females where possible).

Food intake and body weight of the dams and pups were 3–4 days per week and/or weekly measured along lactation and post-weaning periods (infancy, adolescence, and adulthood). At PND 22–23, offspring were weaned, housed in groups (2–3 rats/cage) according to the litter and fed *ad libitum* with the same standard chow. Dams were sacrificed. Feeding behavior tests in the offspring were carried out at the adolescence (postnatal weeks 8–9) and the adulthood (postnatal weeks 12–13). At the postnatal weeks 21–23, adult offspring were finally weighted and sacrificed (Figure 1). In order to minimize the estrous cycle-related variability, the female rats were closely housed in adjacent cages and randomly distributed among the different experimental groups (McClintock, 1978, 1984). Moreover, males



were housed in a separate room. We generated the following four experimental groups: Male offspring from control diet-fed dams (CC male;  $n = 15$ ); Male offspring from calorie-restricted dams (RC male;  $n = 23$ ); Female offspring from control diet-fed dams (CC female;  $n = 16$ ); and Female offspring from calorie-restricted dams (RC female;  $n = 23$ ). To avoid litter effects, samples from 6 to 15 litters per perinatal group were used in all determinations. The criteria described by Vickers were adopted to refer to different stages of development (Vickers et al., 2000).

### Measurement of Caloric Intake

Food intake was determined by subtracting the amount of food left in the cage from the total amount of food provided. To calculate individual food intake when animals were housed in groups, total food intake from each cage was measured and equally divided according to the number of pups per cage. Comparisons among groups were performed by calculating cumulative caloric intake relative to body weight (kcal/kg) at each time point.

### Compulsive Feeding Test

This test was an adaptation of the Compulsive Feeding Test described by Heyne et al. (2009). To assess the feeding behavior, rats were exposed to a free choice between a mixture of chocolates and a standard chow for limited and unlimited time. This test allows us to measure food intake, chocolate preference as well as to detect the development of inflexible feeding behavior. At the beginning of the test, the rats were individually housed and exposed to the two types of food (chocolate and standard chow) for 4 days. Rats had *ad libitum* access to the standard chow and water, and had limited access to the chocolate for 1 h during the light phase. The position of chocolate mixture was switched every day. At the end of the test, animals were returned to their original cages and standard diet. Total caloric intake relative to body weight and chocolate preference (calculated as the percentage of chocolate eaten on overall intake) were evaluated at adolescence (postnatal weeks 8–9) and reevaluated at adulthood (postnatal weeks 12–13) in all experimental groups.

### Test of Feeding Response to AM251

To evaluate the implication of the cannabinoid CB1 receptors in the differential response on caloric intake and chocolate preference, adult rats (postnatal weeks 13–14) were firstly treated with a dose of the CB1 receptor inverse agonist AM251 (3 mg/kg) and then exposed to a free choice between a mixture of chocolates and a standard chow. AM251 (Tocris, Bioscience, Bristol, UK) was dissolved in a vehicle containing 5% Tween 80 and 95% saline. The day before the test, all animals were food-deprived for 20 h. Then AM251 or vehicle was intraperitoneally administered (3 mg/mL). After 30 min, animals were placed in an individual cage without bedding material. Then, they were provided with two small cans containing both types of food that were previously weighed. Chocolate and total caloric intakes relative to body weight (kcal/kg) were calculated for 4 h. We generated the following eight experimental offspring groups: Vehicle in CC male ( $n = 7$ ); AM251 in CC male ( $n = 8$ ); Vehicle in RC male ( $n = 9$ ); AM251 in RC male ( $n = 10$ ); Vehicle in CC female ( $n = 6$ );

AM251 in CC female ( $n = 7$ ); Vehicle in RC female ( $n = 11$ ); and AM251 in RC female ( $n = 11$ ).

### Sample Collection

At 21–23 postnatal weeks, adult offspring were sacrificed by decapitation after the administration of Equitesin<sup>®</sup> (3 mg/kg). This process was carried out in the 2 following hours after the beginning of the dark phase in a separate room from the other experimental animals. Blood samples were briefly collected into tubes containing EDTA (6%) and centrifuged (1500 g for 10 min at 4°C). The plasma was removed, frozen and stored at –80°C for biochemical and hormonal analysis. White perirenal and perigonadal fat were completely dissected out, weighed, frozen, and stored at –80°C until RT-qPCR analyses. The weights of the individual fat depots were used to determine total body fat mass. Liver samples and the brains were also collected, frozen and stored at –80°C. Then, the hypothalamus was dissected out from the base of the brain according the rat brain atlas of Paxinos and Watson (2007).

### Measurement of Metabolites, Hepatic Enzymes, and Leptin in Plasma

The following plasma metabolites and enzymes were measured: basal glucose, triglycerides, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), urea, bilirubin, alkaline phosphatase (ALKP), and the hepatic enzymes alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and gamma-glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ GT). These metabolites were analyzed using commercial kits according to the manufacturer's instructions and a Hitachi 737 Automatic Analyzer (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan). Very low-density lipoprotein (VLDL) were estimated following the Friedewald equation (Warnick et al., 1990) and low-density lipoprotein (LDL) was determined by the modification of Friedewald equation proposed by Ahmadi et al. (2008):  $VLDL = TG/5$ ;  $LDL = [(TChol/1.19) + (TG/1.9) - (HDL/1.1) - 38]$ . The plasma levels of leptin were measured using a commercial rat leptin ELISA kit (Cat. no. RD291001200R; BioVendor, Brno, Czech Republic).

### Measurement of Adiposity

Adiposity was estimated by calculating the percentage of abdominal fat weight over total body weight. The sum of the total deposits of perirenal and perigonadal fat determines the amount of abdominal fat.

### RNA Isolation and Real-Time Quantitative PCR Analysis

We performed real-time qPCR (TaqMan, Life Technologies) as described previously (Decara et al., 2012). Portions (100–300 mg) of liver and PAT, and the whole hypothalamus were homogenized in ice and RNA was extracted using the Trizol<sup>®</sup> method according to the manufacturer's instruction (Gibco BRL). Reverse transcription was carried out from 1  $\mu$ g of RNA using the Transcriptor Reverse Transcriptase kit and random hexamer primers (Transcriptor RT, Roche). Real-time qPCR was performed using a CFX96 Touch<sup>™</sup> Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Primers used were obtained based

on TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays and the FAM<sup>™</sup> dye label format (ThermoFisher; Table S1). We analyzed various housekeeping genes and selected the most suitable according to their homogeneity. Absolute values from each sample were normalized with regard to the housekeeping gene *Actb*. The relative quantification was calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method and normalized to the control group.

## Statistical Analysis

All data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical analysis was performed by using SPSS 20.0 for windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). When appropriate, data from body weight, caloric intake and compulsive feeding test over time were analyzed by Student's *t*-test or three-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) with time, diet and sex as factors. Data from the feeding response to AM251 were analyzed by two-way ANOVA with treatment and diet as factors. Data from gene expression were analyzed by two-way ANOVA with diet and sex as factors. In all cases, multiple comparisons were assessed by Bonferroni *post-hoc* test. A  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### Effect of Prenatal Caloric Restriction on Body Weight and Caloric Intake in Dams and Their Offspring in Gestation, Lactation, and/or Postweaning Periods

Body weight gain and cumulative caloric intake relative to body weight in dams were evaluated after the gestation and lactation periods (Figure 2A). Statistical analysis indicated a significant decrease in body weight gain and caloric intake in the calorie-restricted dams after gestation. In contrast, calorie-restricted dams exhibited an increase in body weight gain after lactation, despite of the lack of effect on caloric intake during this period.

Body weight and cumulative caloric intake relative to body weight in offspring were evaluated during the lactation and/or post-weaning periods (Figures 2B,C). From birth to PND 22 (lactation), three-way repeated measures ANOVA showed a main and significant effect of time on body weight [ $F_{(22, 145)} = 675.53$ ,  $P < 0.001$ ; Figure 2B]. No effects of diet and sex were detected, but interaction between time and diet was significant [ $F_{(22, 145)} = 11.27$ ,  $P < 0.001$ ]. Particularly, Bonferroni analysis indicated that RC male offspring were born normoweight but displayed higher body weight than CC male offspring in several days of the lactation period (PND 1–2 and PND 9–11). We only found a difference between RC and CC female offspring at PND 20. Additionally, RC males exhibited an increase in body weight than RC females in several days of the lactation period (PND 1 and PND 2–5, 16, 17, and 2). However, no differences in body weight were found between CC males and CC females (Figure 2B).

Regarding the body weight during the post-weaning period (Figure 2C), three-way ANOVA detected a main effect of time [ $F_{(16, 58)} = 689.326$ ,  $P < 0.001$ ] and sex [ $F_{(1, 73)} = 436.92$ ,  $P < 0.001$ ]. Interaction between time and diet, time and

sex, and time, diet, and sex were also significant [ $F_{(16, 58)} = 1.83$ ,  $P < 0.05$ ;  $F_{(16, 58)} = 72.72$ ,  $P < 0.001$ ;  $F_{(16, 58)} = 2.72$ ,  $P < 0.01$ , respectively]. Specifically, Bonferroni analysis indicated that RC males also displayed higher body weight than CC males in several weeks of the post-weaning period that comprise the adulthood (postnatal weeks 15–18 and postnatal week 19). However, no differences in body weight between CC and RC females were found. Additionally, both CC and RC males exhibited an increase in body weight compared to the respective CC (postnatal week 7 on) and RC (postnatal week 6 on) females in a time period that comprise most weeks of the adolescence and adulthood (Figure 2C).

Concerning to cumulative caloric intake relative to body weight during the post-weaning period (Figure 2D), we found a main effect of time [ $F_{(15, 59)} = 1712.38$ ,  $P < 0.001$ ] and sex [ $F_{(1, 73)} = 30.20$ ,  $P < 0.001$ ]. Additionally, we detected interaction between time and diet [ $F_{(15, 59)} = 2.19$ ,  $P < 0.05$ ], time, and sex [ $F_{(15, 59)} = 13.28$ ,  $P < 0.001$ ] and time, diet, and sex [ $F_{(15, 59)} = 1.92$ ,  $P < 0.05$ ]. Particularly, Bonferroni analysis indicated that RC males and RC females did not display higher caloric intake compared to the respective CC males and CC females. CC females exhibited an increased caloric intake than CC males from the 13th postnatal week (adulthood) onward, meanwhile RC females showed a higher caloric intake than RC males from the 7th postnatal week (adolescence) to adulthood (Figure 2D).

### Long-Term Effect of Prenatal Caloric Restriction on Food Preference in Adolescent and Adult Offspring

Compulsive feeding test (chocolate preference and total caloric intake) was evaluated in adolescent and adult offspring at postnatal weeks 8–9 and 12–13, respectively (Figures 3A–D). Regarding chocolate preference in adolescence (Figure 3A), three-way ANOVA showed a main effect of time [ $F_{(3, 65)} = 474.01$ ,  $P < 0.001$ ], diet [ $F_{(1, 67)} = 7.49$ ,  $P < 0.01$ ], and sex [ $F_{(1, 67)} = 37.81$ ,  $P < 0.001$ ]. We also detected interaction between time and sex [ $F_{(3, 65)} = 13.55$ ,  $P < 0.001$ ]. Bonferroni analysis showed that RC adolescent females exhibited a decrease in chocolate preference at the second day of the test. Additionally, CC and RC adolescent females showed an increase in chocolate preference than the respective CC and RC adolescent males (days 1, 2, and 4; Figure 3A). At adulthood (Figure 3B), we found a main effect of time [ $F_{(3, 71)} = 462.90$ ,  $P < 0.001$ ] and sex [ $F_{(1, 73)} = 13.99$ ,  $P < 0.001$ ] on chocolate preference. We also detected interaction between time and diet [ $F_{(3, 71)} = 3.64$ ;  $P < 0.05$ ], and time and sex [ $F_{(3, 71)} = 2.954$ ,  $P < 0.05$ ]. Bonferroni analysis indicated that CC and RC adult females displayed higher chocolate preference than the respective CC and RC adult males (days 1, 2, and 4). However, no differences in chocolate preference were found between CC and RC offspring at adulthood (Figure 3B).

Concerning to total caloric intake relative to body weight in adolescence (Figure 3C), we detected a main effect of time [ $F_{(3, 65)} = 272.872$ ;  $P < 0.001$ ], sex [ $F_{(1, 67)} = 25.663$ ;  $P < 0.001$ ],





TABLE 1 | Plasma levels of leptin, metabolites, alkaline phosphatase, and hepatic transaminases in adult rat offspring at postnatal weeks 21–23<sup>†</sup>.

	Male		Female		Two-way ANOVA		
	CC (n = 6)	RC (n = 7)	CC (n = 5)	RC (n = 7)	Interaction	Prenatal diet	Sex
Leptin (ng/mL)	5.82 ± 0.88	12.06 ± 2.13*	6.07 ± 2.17	5.97 ± 1.36 <sup>\$\$</sup>	ns	ns	ns
Glucose (mg/dL)	187.33 ± 12.11	207.71 ± 19.27	169.60 ± 15.65	216.00 ± 10.86 <sup>#</sup>	ns	$F_{(1,22)} = 5.339$ , $P = 0.031$	ns
Triglycerides (mg/dL)	79.50 ± 3.12	114.13 ± 9.66*	82.60 ± 15.96	96.50 ± 11.64	ns	$F_{(1,22)} = 5.462$ , $P = 0.029$	ns
Cholesterol (mg/dL)	39.00 ± 5.49	44.86 ± 2.13	37.20 ± 2.53	31.13 ± 2.56 <sup>\$\$\$</sup>	ns	Ns	$F_{(1,22)} = 6.112$ , $P = 0.022$
HDL (mg/dL)	26.67 ± 3.04	4.43 ± 0.81***	21.60 ± 2.91	2.12 ± 0.55 <sup>###</sup>	ns	$F_{(1,22)} = 147.457$ , $P < 0.001$	$F_{(1,22)} = 4.603$ , $P = 0.043$
LDL (mg/dL)	12.37 ± 2.79	55.67 ± 3.5***	17.09 ± 8.37	37.01 ± 7.55 <sup>#, \$</sup>	ns	$F_{(1,22)} = 29.887$ , $P < 0.001$	Ns
VLDL (mg/dL)	15.90 ± 0.62	22.863 ± 1.93*	16.52 ± 3.19	19.30 ± 2.33	ns	$F_{(1,22)} = 5.462$ , $P = 0.029$	Ns
Urea (mg/dL)	27.50 ± 2.89	31.25 ± 1.66	30.40 ± 2.02	34.75 ± 2.07	ns	$F_{(1,22)} = 4.876$ , $P = 0.038$	ns
Bilirubin (mg/dL)	0.13 ± 0.02	0.30 ± 0.07*	0.20 ± 0.05	0.16 ± 0.02 <sup>\$</sup>	$F_{(1,22)} = 5.733$ , $P = 0.026$	ns	ns
ALKP (UI)	73.13 ± 3.39	72.14 ± 3.48	63.20 ± 7.79	65.43 ± 2.30	ns	ns	$F_{(1,23)} = 4.608$ , $P = 0.043$
γGT (UI)	10.50 ± 1.01	10.86 ± 0.34	12.20 ± 0.96	11.50 ± 0.93	ns	ns	Ns
AST (UI)	162.50 ± 33.02	138.14 ± 18.33	145.00 ± 20.39	133.14 ± 1.21	ns	ns	Ns
ALT (UI)	55.00 ± 3.96	69.86 ± 6.82	70.40 ± 8.37	56.63 ± 7.27	$F_{(1,22)} = 4.697$ , $P = 0.041$	ns	Ns
AST/ALT	0.39 ± 0.06	0.52 ± 0.03	4.05 ± 0.24***	4.84 ± 0.25 <sup>\$\$\$</sup>	ns	ns	$F_{(1,23)} = 452.066$ , $P < 0.001$

<sup>†</sup>CC, offspring from control-fed dams; RC, offspring from calorie-restricted dams. Values are expressed as means ± S.E.M. Two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test: \*!\*\*\*P < 0.05/0.001 vs. CC males; #/###P < 0.05/0.001 vs. CC females; \$/\$\$/\$\$\$P < 0.05/0.01/0.001 vs. RC males; ns, non-significant.

and AST/ALT ratio was also observed. Interaction between diet and sex was found in the plasma levels of bilirubin and ALT (Table 1), and an almost significant interaction in leptin levels [ $F_{(1,18)} = 3.349$ ,  $P = 0.084$ ]. Bonferroni analysis indicated that the RC males showed a significant increase in the plasma levels of leptin, triglycerides, VLDL, and bilirubin compared to the plasma of CC males. The RC females presented an increase in the plasma levels of glucose. The plasma levels of LDL were significantly increased in RC males and females. The plasma levels of HDL were significantly decreased in RC males and females. Additionally, RC females showed lower plasma levels of leptin, total cholesterol, LDL, and bilirubin than RC males. The plasma of CC and RC females presented a higher AST/ALT ratio than the plasma of CC and RC males, respectively (Table 1).

### Long-Term Effect of Prenatal Caloric Restriction on Adiposity in Adult Offspring

We detected a prenatal diet effect on perirenal, perigonadal, and abdominal fat weights, and in the percentage of perirenal and abdominal fat relative to body weight (Table 2). Moreover, we observed a sex effect on perirenal, perigonadal and abdominal fat weights, and in the percentage of perigonadal fat relative to body weight. Interaction between diet and sex was only found in the perirenal fat weight. Bonferroni analysis indicated that

RC male exhibited an increase in the perirenal, perigonadal, and abdominal fat weights, and in the percentage of perirenal fat compared to those of the CC males. No differences in adiposity were observed between CC and RC females (Table 2). CC and RC females showed a lower perirenal, perigonadal, and abdominal fat weights than those of the respective CC and RC males. Moreover, RC females also exhibited a reduction in the percentage of perirenal fat relative to body weight compared to RC males. Based on the main effects on adiposity, the perirenal fat was considered the most suitable adipose tissue for gene expression analysis.

### Long-Term Effect of Prenatal Caloric Restriction on the ECS Gene Expression in Hypothalamus, Liver, and Perirenal Adipose Tissue of Adult Offspring

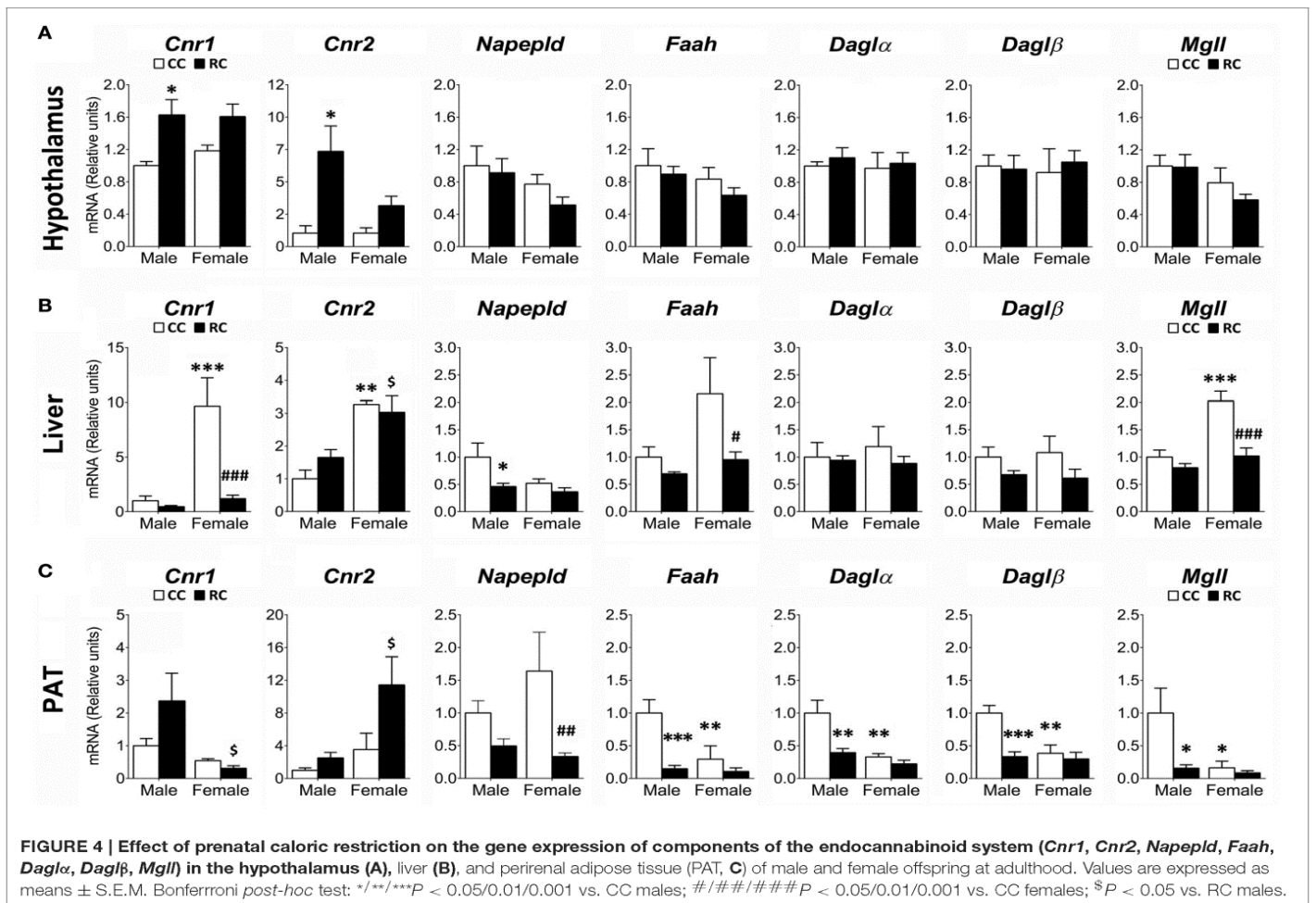
Gene expression of relevant ECS components (*Cnr1*, *Cnr2*, *Napepld*, *Faah*, *Dagla*, *Daglb*, *Mgl1*) was evaluated in the hypothalamus, the liver and the PAT of male and female offspring from rat dams which were exposed to an *ad libitum* access of a standard chow (CC) or a 20%-restricted access of the same standard chow (RC) during pregestational (2 weeks) and gestational periods (Figure 4).

Two-way ANOVA showed a main effect of the diet on the gene expression of *Cnr1* in hypothalamus and liver, *Cnr2* in

**TABLE 2 | Levels of adiposity in perirenal, perigonadal and abdominal fat of rat adult offspring at postnatal weeks 21–23<sup>†</sup>.**

	Male		Female		Two-way ANOVA		
	CC (n = 12)	RC (n = 15)	CC (n = 11)	RC (n = 17)	Interaction	Prenatal diet	Sex
Perirenal fat (g)	8.90 ± 0.41	12.30 ± 0.64***	4.82 ± 0.36***	5.73 ± 0.69\$\$\$	$F_{(1,51)} = 4.214$ , $P = 0.045$	$F_{(1,51)} = 12.542$ , $P = 0.001$	$F_{(1,51)} = 76.281$ , $P < 0.001$
Perirenal fat/BW (%)	1.97 ± 0.08	2.47 ± 0.12*	1.80 ± 0.12	2.06 ± 0.19 <sup>§</sup>	ns	$F_{(1,51)} = 6.106$ , $P = 0.017$	ns
Perigonadal fat (g)	9.32 ± 0.61	11.32 ± 0.70*	6.14 ± 0.67**	7.2 ± 0.49\$\$\$	ns	$F_{(1,51)} = 4.059$ , $P = 0.049$	$F_{(1,51)} = 34.261$ , $P < 0.001$
Perigonadal fat/BW (%)	2.06 ± 0.12	2.27 ± 0.13	2.29 ± 0.21	2.66 ± 0.14	ns	Ns	$F_{(1,51)} = 4.111$ , $P = 0.048$
Abdominal fat (g)	18.22 ± 0.94	23.63 ± 1.14**	10.96 ± 0.96***	12.95 ± 1.11\$\$\$	ns	$F_{(1,51)} = 11.302$ , $P = 0.001$	$F_{(1,51)} = 66.545$ , $P < 0.001$
Abdominal fat/BW (%)	4.03 ± 0.18	4.74 ± 0.20	4.15 ± 0.28	4.72 ± 0.30	ns	$F_{(1,51)} = 6.163$ , $P = 0.016$	ns

<sup>†</sup>CC, offspring from control-fed dams; RC, offspring from calorie-restricted dams. Values are expressed as means ± S.E.M. Two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test: \*/\*\*/\*\*\* $P < 0.05/0.01/0.001$  vs. CC males; <sup>§</sup>/\$\$\$ $P < 0.05/0.001$  vs. RC males; ns, non-significant.





hypothalamus and PAT, *Napepld*, *Faah*, *Daglβ*, and *Mgll* in liver and PAT, and *Daglα* in PAT (see Table S2 for statistical values). We also found a sex effect on the gene expression of *Cnr1*, *Cnr2*, and *Faah* in liver and PAT, *Mgll* in hypothalamus and PAT, *Napepld* in liver, and *Daglα* and *Daglβ* in PAT. No interaction between diet and sex was detected in hypothalamus, but it was found in the gene expression of *Cnr1* and *Mgll* in liver, and *Faah*, *Daglα*, and *Daglβ* in PAT (Table S2). Bonferroni analysis indicated a significant increase in the gene expression of *Cnr1* and *Cnr2* in the hypothalamus of RC male offspring compared to CC ones (Figure 4A). In contrast, the RC males presented lower levels in the gene expression of *Napepld* in liver, and *Faah*, *Daglα*, *Daglβ*, and *Mgll* in PAT whereas RC females showed lower levels in the gene expression of *Cnr1*, *Faah*, and *Mgll* in liver, and *Napepld* in PAT, compared to those of their respective CC offspring (Figures 4B,C). Differences between male and female offspring (CC) were also observed. CC females showed an increase in the gene expression of *Cnr1*, *Cnr2*, and *Mgll* in liver, but a decrease in the gene expression of *Faah*, *Daglα*, *Daglβ*, and *Mgll* in PAT (Figures 4B,C).

### Long-Term Effect of Prenatal Caloric Restriction on the Gene Expression of Lipid and Cholesterol Metabolism in Liver and Perirenal Adipose Tissue of Adult Offspring

Gene expression of relevant metabolic enzymes regulating *de novo* lipogenesis (*Acaca*, *Fasn*, *Scd1*) and fatty-acid  $\beta$ -oxidation (*Cpt1a*, *Cpt1b*, *Acox1*), and key regulators of lipid and cholesterol metabolism (*Chrebp*, *Srebp1/2*, *Insig1/2*, *Hmgcr*) and mitochondrial respiration (*Ucp1*, *Cox4i1*) was also evaluated in the liver and the PAT (Figure 5).

Two-way ANOVA showed a main effect of the diet on the gene expression of *Cpt1a*, *Cpt1b*, and *Acox1* in liver and PAT, *Acaca*, *Fasn*, *Insig1*, and *Hmgcr* in liver, and *Chrebp*, *Scd1*, and *Cox4i1* in PAT (see Table S3 for statistical values). We also found a sex effect on the gene expression of *Chrebp*, *Acaca*, *Acox1*, *Srebp1/2*, *Insig1/2*, and *Hmgcr* in liver, and *Scd1*, *Cpt1b*, and *Cox4i1* in PAT. Interaction between diet and sex was detected in the gene expression of *Acaca*, *Fasn*, *Acox1*, and *Insig1* in liver, and *Scd1* and *Cpt1b* in PAT (Table S3). Bonferroni analysis indicated that RC females presented a significant decrease in the gene expression of *Acaca*, *Fasn*, *Cpt1a*, *Acox1*, *Insig1*, and *Hmgcr* in liver, and *Scd1* in PAT compared to that of CC ones (Figures 5A–C). RC male offspring showed a decrease in the gene expression of *Cpt1b*, *Acox1*, and *Cox4i1* in PAT (Figures 5C,D). Differences between male and female offspring (CC) were also observed. CC females showed an increase in the gene expression of *Acaca* and *Insig1* in liver, and *Scd1* in PAT, compared to CC males (Figures 5A–C). In contrast, CC females exhibited a decrease in the gene expression of *Cpt1b* and *Cox4i1* (Figures 5C,D).

### Long-Term Effect of Prenatal Caloric Restriction on the Gene Expression of *Pparα* and *Pparγ* in Liver and Perirenal Adipose Tissue of Adult Offspring

Gene expression of relevant transcription factors (*Pparα*, *Pparγ*) regulating the expression of genes implicated in lipid and

carbohydrate metabolism was also evaluated in the liver and the PAT (Figure 6).

Two-way ANOVA showed effects of diet and sex on the gene expression of *Pparγ* in liver and PAT (see Table S4 for statistical values). Additionally, a main effect of sex was also detected on the gene expression of *Pparα* in liver. Interaction between diet and sex was found in the liver *Pparα* gene expression and the PAT *Pparγ* gene expression (Table S4). Bonferroni analysis indicated that while RC female offspring showed a decrease in the gene expression of *Pparα* and *Pparγ* in liver (Figure 6A), RC males only presented a significant decrease in the gene expression of *Pparγ* in PAT (Figure 6B), compared to CC ones. Regarding the differences between male and female offspring, CC females showed an increase in the gene expression of *Pparα* in liver, but a decrease in the gene expression of *Pparγ* in PAT (Figures 6A,B).

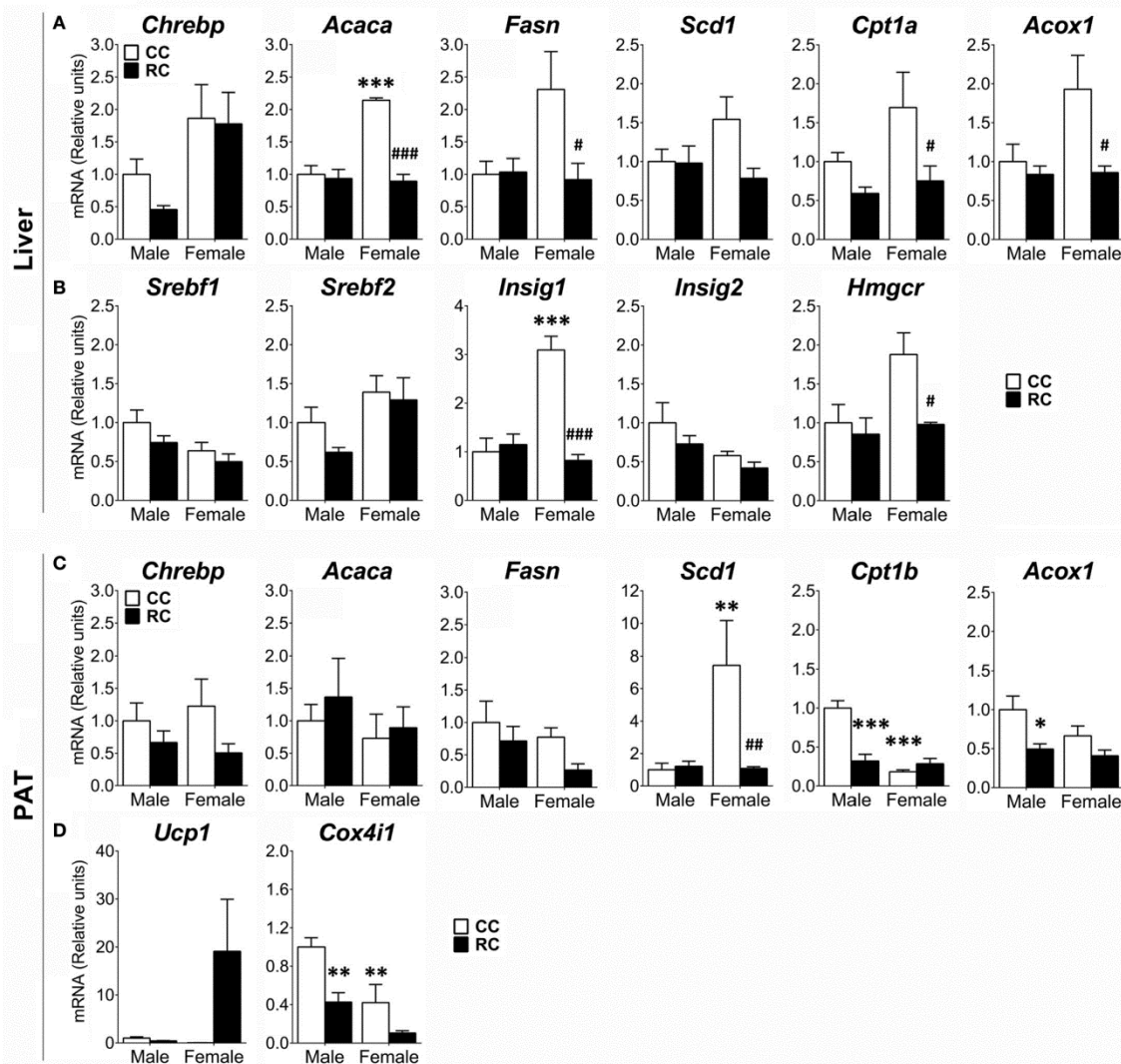
## DISCUSSION

This study demonstrates that the maternal exposure to a moderate (20%) caloric restriction (undernutrition) during preconceptional (2 weeks) and gestational (up 2 days before birth) periods produced long-term effects on body weight, feeding behavior and gene expression of key components of the ECS (receptors and enzymes) in a sex-dependent manner. These effects extended to lipid and cholesterol metabolic pathways, suggesting the existence of a complex pattern alterations derived of adaptation to maternal malnutrition.

### A Moderate Maternal Caloric Restriction Produces Sex-Dimorphic Effects in Feeding and Body Weight Gain Only after Weaning

The dams exposed to undernutrition during prenatal stages exhibited a reduction in their body weight gain and caloric intake during gestation that contrasts with the increase in their body weight during lactation with normal nutrition. Moreover, their offspring displayed normoweight at birth and during lactation in a sex and diet-independent manner. This finding is in agreement with previous studies in humans, which demonstrated that offspring exposed to famine or hyperemesis gravidarum in the first part of pregnancy did not show lower birth weight (Roseboom et al., 2006; Grooten et al., 2015). Similarly, animal studies documented normoweight at birth when the early pregnancy was conducted under caloric restriction (Cleal et al., 2007; Palou et al., 2010; Poore et al., 2010). In contrast, a lower weight at birth has been described in several studies when the calorie-restricted diet was prolonged to birth (Desai et al., 2005; Lukaszewski et al., 2011). An explanation that emerges from these studies is that the putative fetal underweight caused by maternal undernutrition may be recovered in few days of normal nutrition, as was previously suggested (Cleal et al., 2007; Ramírez-López et al., 2016). Returning to our data, weight recovery in offspring may occur as a result of an accelerated catch-up growth before birth caused by an *ad libitum* maternal feeding.

The differential response to the maternal undernutrition in energy balance is sexual dimorphism dependent during the post-weaning periods. The results indicated that CC male rats

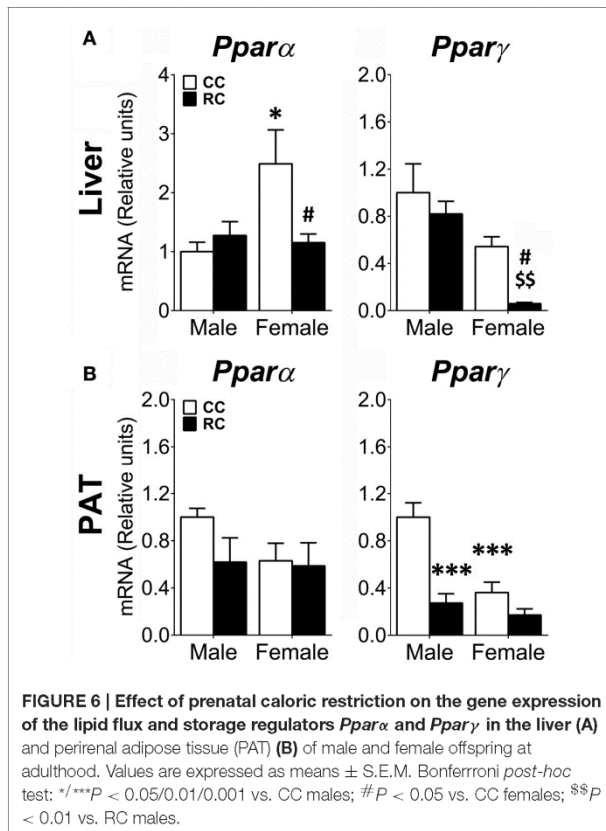


**FIGURE 5 |** Effect of prenatal caloric restriction on the gene expression of enzymes and regulators of the lipogenesis (*Chrebp*, *Acaca*, *Fasn*, *Scd1*), fatty-acid  $\beta$ -oxidation (*Cpt1a/b*, *Acox1*), cholesterol metabolism (*Srebf1/2*, *Insig1/2*, *Hmgcr*), and thermogenesis/mitochondria respiration (*Ucp1*, *Cox4i1*) in the liver (A,B) and/or perirenal adipose tissue (PAT) (C,D) of male and female offspring at adulthood. Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Bonferroni post-hoc test: \*/\*\*/\*\*\* $P < 0.05/0.01/0.001$  vs. CC males; #/#/#/#/# $P < 0.05/0.01/0.001$  vs. CC females.

showed an increase in body weight and abdominal fat mass that contrasted with a decrease in caloric intake and compulsive feeding during the adolescence and adulthood compared to CC female rats. As we will discuss below, these sex-differences extend to metabolic pathways under the control of the endogenous cannabinoid system, as previously suggested (Wagner, 2016). Thus, the effects of the maternal caloric restriction on the energy balance of male and female offspring should be interpreted based on their sex-dependent basal metabolism.

The adult male offspring from calorie-restricted dams exhibited an increase in body weight and a higher restriction

in total caloric intake after the administration of AM251, a CB1 receptor inverse agonist with anorexigenic and anti-obesity properties. The increase in body weight of RC male offspring is directly associated with an increase in abdominal fat and, particularly, a higher percentage of perirenal adiposity relative to body weight. The elevated fat mass and body weight justify the higher levels of triglycerides, LDL, VLDL, bilirubin, and the adipocytes-specific satiety hormone leptin in plasma. In contrast, the female offspring from calorie-restricted dams did not show changes in body weight and adiposity, but exhibited higher levels of LDL and glucose in plasma, and a reduction



in chocolate preference at adolescence and total caloric intake at adulthood. The lower compulsive feeding in RC females can be associated with the hyperglycemia via a hypothalamic impairment of glucose-sensing to control hunger and satiety (Routh et al., 2014).

Previous researches have demonstrated metabolic alterations after undernutrition in a sex-dependent manner. Increased adiposity, lipid profile, glycemia, and leptinemia in male offspring have been reported after the exposure to a moderate undernutrition at different pregnancy periods (Desai et al., 2007a; Palou et al., 2010). Concerning the potential explanations of the differential phenotypic features between males and females, the leptin sensibility can play an important role. Indeed, the higher leptin levels in plasma without reduction in food intake suggest leptin resistance and, therefore, an altered leptin signaling (Friedman and Halaas, 1998). A putative decrease in hypothalamic sensitivity to leptin may result in an inability to detect satiety despite the fat stores, which finally develop to obesity (Sasaki, 2015). The higher leptin sensitivity described in females than in males has been associated with gonadal hormones (Clegg et al., 2003, 2006) and may explain in part the higher levels of leptin found in the plasma of male offspring. Furthermore, the placenta responses to maternal diet in a sex-specific manner (Tarrade et al., 2015), suggesting that the sexual dimorphism in adiposity-relevant parameters could be present at very early stages.

## Effects of Moderate Maternal Caloric Restriction on Feeding Behavior

This differential sex effect on body weight after maternal caloric restriction was in agreement with data from previous studies (Palou et al., 2010). The obvious explanations to the higher body weight found in RC males after weaning could be as a consequence of an increased food intake, decreased energy expenditure or higher metabolic efficiency. Concerning hyperphagia, several studies have reported this feeding alteration after the exposure to undernutrition in critical windows of development (Vickers et al., 2000; Desai et al., 2005; Breton et al., 2009; Palou et al., 2010; Lukaszewski et al., 2011; Manuel-Apolinar et al., 2014), so it has been proposed as an important contributor of the excessive body weight. Intriguingly, our data indicated that either male or female offspring from calorie-restricted dams did not display higher caloric intake after weaning, despite of the fact that the males exhibited greater body weight at adulthood. Indeed, discrepancies were also found in the literature. For instance, it has been also documented excessive body weight in absence of higher food intake (Yura et al., 2005; Sebert et al., 2009; Theys et al., 2011). Evidence in some studies pointed out that hyperphagia could be a transitory effect that disappears when the overweighted animals after maternal undernutrition were able to reach the weight as controls (Vickers et al., 2000; Lukaszewski et al., 2011). So, hyperphagia could be a compensatory effect after prolonged underweight. In this context, it is plausible in our experimental model that RC offspring did not showed underweight and, therefore, hyperphagia in any stage. It is important to note that when caloric intake is adjusted to body weight the effect of maternal caloric restriction on appetite seems more discrete (Lagisz et al., 2014). One possibility that emerges from our data is that male offspring can increase their body weight by either a reduction of energy expenditure or higher metabolism efficiency. This fact might be a consequence of the inadequate fetal programming of metabolic systems involved in energy homeostasis (Hales and Barker, 2001; Vaag et al., 2012). The analysis of the cannabinoid-regulated metabolism, such as the expression of key enzymes, receptors and regulators of the lipid and cholesterol metabolism, could provide some clues to what may be happening.

In order to further investigate the effect of maternal caloric restriction on feeding behavior we performed a compulsive feeding test in the adult offspring. The effect observed in the RC offspring were contrary to those from previous studies, which described either, an increased preference for higher caloric diets after exposure to caloric restriction during pregnancy (Lussana et al., 2008; Palou et al., 2010) or hyperphagia in animals fed with a high-fat diet (Lukaszewski et al., 2011). Different factors can partially explain the discrepancies found in food preferences. Regarding the time exposure to diet, Palou et al. (2010) described a higher preference for a fat-rich liquid diet in male offspring fed for 1 h after an adaptation period of 8 days (habituation to diet). However, our data indicated a lower preference for a novel highly-palatable food (chocolate mixture) than the familiar standard diet in RC females when they were exposed for 4 days. The lower

acceptance to novel foods has been found in animals with protein deficiency from early gestational stages (Peregoy et al., 1972; Pettus et al., 1974) and could be associated with abnormal behaviors in adulthood related to anxiety (Peleg-Raibstein et al., 2012). Regarding the timing of restriction, protein deficiency during early pregnancy induces a less preference to a high-fat diet in the female offspring (Bellinger and Langley-Evans, 2005), whereas a high preference was obtained when restriction was applied through other gestational periods (Bellinger et al., 2004; Bellinger and Langley-Evans, 2005). According to our results, a maternal caloric restriction prior to mating could be critical for the less compulsive feeding observed in female offspring.

The tendency to lower chocolate preference suggests an increased threshold of the palatability. Interestingly, the ECS is implicated in the intake of palatable food (DiPatrizio and Simansky, 2008) and the perception of sweet taste (Niki et al., 2015). The CB1 receptor inverse agonist AM251 was able to decrease the motivation to obtain highly palatable food in a free choice test (Mathes et al., 2008; Droste et al., 2010; Deshmukh and Sharma, 2012). According to this, AM251 was specifically able to reduce chocolate intake in CC male offspring, but not in CC females or RC males. Interestingly, caloric restriction induced a higher reduction in total intake in the female offspring treated with AM251. This subtle difference may indicate some alterations in the central rewarding functions of the ECS, as was previously described in animals with reduced preference for highly palatable foods (Brand et al., 2012).

### Impact of Maternal Caloric Restriction on the Expression of the Endogenous Cannabinoid System in Organs Related to Energy Expenditure and Metabolism

The sex-dependent effects of maternal caloric restriction on feeding behavior and metabolic profile in offspring can be a result of a differential re-programming in energy metabolism. Moreover, long-lasting changes in the gene expression of components of the ECS, which modulates appetite and energy homeostasis, and other key enzymes and regulators of lipid and cholesterol metabolism, were found in metabolically relevant tissues (liver and PAT) of adult offspring in a sex-dependent manner. The adult male offspring from calorie-restricted dams specifically exhibited an increased gene expression of the cannabinoid receptors *Cnr1* and *Cnr2* in the hypothalamus, and showed a decreased gene expression of the eCBs-metabolizing enzymes *Napepld* in liver, and *Faah*, *Dagla*, *Daglb*, and *Mgll* in PAT. These results likely indicate that the up-expression of the cannabinoid receptors in the hypothalamus at adulthood may result from a lower long-term cannabinoid activity that, in turn, could be produced by lower levels of eCBs and N-acylethanolamines (NAEs) in the hypothalamus of male offspring as was previously described at birth (Ramírez-López et al., 2016). This interpretation also agrees with the down-regulation of the endocannabinoid metabolism in peripheral tissues. However, the adult female offspring from calorie-restricted dams showed a decreased gene expression of *Cnr1* and the eCBs-degrading enzymes *Faah* and *Mgll* in liver as well as the NAEs-synthesizing

enzyme *Napepld* in PAT. The prominent down-regulation of the eCBs-degrading enzymes in the liver of RC females may result in a different endocannabinoid signaling than that of RC males. Higher endocannabinoid levels as a result of a lower expression of the eCBs-degrading enzymes *FAAH* and *MAGL* in liver can be associated with alterations in the lipid and cholesterol metabolism (Dinh et al., 2002; Osei-Hyiaman et al., 2005; Di Marzo and MacCarrone, 2008), due to the fact that both eCBs anandamide (AEA) and 2-AG can inhibit the gene expression of apolipoprotein A1, the primary protein component of HDL, through the activation of CB1 receptors in hepatocytes (Haas et al., 2012). Despite of these alterations, in general, the female phenotype seems less severely affected after the exposure to maternal undernutrition in early development. Any explanation for these dimorphisms should be supported by the elevated gene expression of *Cnr2* in the liver and PAT of the RC female offspring compared to those of the RC males. Interestingly, the CB2 receptor activation was associated with anti-obesity effects (Verte et al., 2015) and a decreased risk for cardiovascular diseases. For instance, the gene deletion of the 2-AG-degrading enzyme *Mgll* has been linked to attenuation of diet-induced insulin resistance and improvement of atherosclerosis via CB2 activation (Taschler et al., 2011; Vujic et al., 2016). Taken in account the lower impact of the exposure to undernutrition observed in females in particular, and the lower risk of cardiovascular diseases described in females in general (Blenck et al., 2016), we can speculate that the CB2 receptor up-regulation may play a protective role in adverse metabolic conditions.

The higher gene expression of *Cnr1* in the hypothalamus, which was subtly more evident in male than female offspring from calorie-restricted dams, was not so clear in previous studies (Matias et al., 2003). Matias et al. (2003) demonstrated a decrease in the hypothalamic levels of AEA (confirmed by Ramírez-López et al., 2016) and an absence of significant changes in the gene expression of *Cnr1* and *Faah* in the hypothalamus of weaned pups after a maternal undernutrition throughout the last part of pregnancy and/or lactation. A possible explanation of this discrepancy could be related to the critical consequences of the maternal undernutrition at preconceptional periods. The up-expression of *Cnr1* in the hypothalamus has been associated with the leptin resistance in obesity (Thanos et al., 2008; Cardinal et al., 2012). This fact agrees with the increased body weight and the higher plasma levels of leptin in RC male offspring despite of the absence of hyperphagia or alterations in hypothalamic endocannabinoid machinery. It was described that long-term undernutrition from early stages lead to higher gene expression of *Cnr1* in several brain regions of the leptin-deficient obese Zucker rats (Thanos et al., 2008). These findings indicate that leptin action and, therefore, the normal function of leptin receptors reduces the endocannabinoid tone and CB1 receptor activity (Di Marzo et al., 2001). Regarding the absence of hyperphagia, it is important to note that the food intake has been associated with the cannabinoid activation in specific hypothalamic areas (Soria-Gomez et al., 2014). However, previous studies suggested that specific CB1 receptor deletion in the hypothalamus was able to decrease body weight and increase energy expenditure, but was

not accompanied with changes in food intake (Cardinal et al., 2012).

The hypothalamus is able to cross-talk to other metabolically relevant tissues such as liver and adipose tissue through sympathetic circuits and circulating signals (leptin, insulin, CCK, neurotrophins, IL-6) by the homeostatic regulation of the endocannabinoid signaling system (Das, 2010; Maccarrone et al., 2014; Seoane-Collazo et al., 2015). Therefore, an alteration in the hypothalamic levels of endocannabinoids in newborn animals, as was previously described by Ramírez-López et al. (2016), could impair the sympathetic neurotransmission and hormones involved in energy metabolism (Di Marzo et al., 2001; Keimpema et al., 2013, 2014; Cristino et al., 2014). Thus, the down-expression of the eCBs-degrading enzymes *Faah* and *Mgl1* in the PAT of RC male offspring is consistent with an obese phenotype, hyperleptinemia, adiposity, and alterations in lipid metabolism in absence of increased food intake, as was previously described in animals with deficiency of FAAH and MAGL (Tourino et al., 2010; Geurts et al., 2015). In contrast, the decreased gene expression of the 2-AG-synthesizing enzymes *Dagla* and *Dagl2* is opposed to what was previously found in the adipose tissue of obese subjects (Engeli et al., 2014). Therefore, the down-regulation of the endocannabinoid machinery in the adipose tissue of male offspring at adulthood may result in a putative compensatory effect in order to respond to an unbalanced endocannabinoid tone originated at birth after maternal undernutrition.

### Maternal Caloric Restriction Induces Sex-Dimorphic Alterations in the Expression of Genes Involved in Lipid Metabolism

Sexual dimorphism in offspring after maternal caloric restriction was also observed in the gene expression of key enzymes and regulators of the lipid and cholesterol metabolism that include elements of the fatty-acid  $\beta$ -oxidation. The PAT of adult male offspring from calorie-restricted dams specifically exhibited a decrease in the gene expression of the  $\beta$ -oxidation enzymes *Cpt1b* and *Acox1*, the mitochondrial respiratory chain subunit *Cox4i1* and the lipid storage-stimulating transcription factor *Ppar $\gamma$* . The down-expression of all these elements in PAT indicates lower energy expenditure in RC males, which agrees with the increased perirenal adiposity and the higher levels of triglycerides in plasma. These features were also linked to an impairment of the browning process of the white adipose tissue (Geurts et al., 2015). Despite we found a decrease in the gene expression of *Ppar $\gamma$* , opposite results after the exposure to undernutrition (Bispham et al., 2005) and similar results after malnutrition during early development have been documented (Ahmad et al., 2013; Reynolds et al., 2014). Interestingly, the decreased gene expression of *Ppar $\gamma$*  has been linked to inflammatory processes associated with obesity and insulin resistance (Odegaard et al., 2007; Reynolds et al., 2014), an issue that enhances the importance of the inflammatory responses in the developmental programming.

The liver of adult female offspring from calorie-restricted dams specifically showed a decrease in the gene expression of *Ppara* and *Ppar $\gamma$* . As these nuclear receptors has been also linked to the activation of fatty-acid  $\beta$ -oxidation and insulin sensitivity (Auwerx, 1999; Minnich et al., 2001), their decreased levels in RC females might be associated to alterations in lipid and glucose metabolism (Liu et al., 2015). The liver of RC females also showed a decrease in the gene expression of the *de novo* lipogenic enzyme *Acaca* and *Fasn*, which constitute rate-limit steps in the fatty-acid synthesis, and the liver-specific cholesterol biosynthesis regulators *Insig1* and *Hmgcr*. The down-expression of these elements suggests a reduction of fatty-acid and cholesterol biosynthesis in the liver of RC females, which could partially explain the altered levels of the lipid carriers high-density, low-density and very low-density lipoproteins (HDL, LDL, and HDL) in plasma. The HDL was 10-fold reduced in the plasma of RC females, which indicates a significant reduction of the outlet rate of fat molecules (cholesterol, phospholipids and triglycerides) from cells. In contrast, the LDL was two-fold increased in the plasma of RC females, which is strongly associated with atherosclerosis within the artery wall and poses a risk for cardiovascular disease. Similarly to human cohort studies, our results emphasize the importance of early life programming as the exposure to undernutrition during early development increases the risk from suffering features of metabolic syndrome and cardiovascular disease later in life (Desai et al., 2005, 2007b; Jimenez-Chillaron et al., 2005; Yura et al., 2005; Breton et al., 2009; Palou et al., 2010; Suzuki et al., 2010; Lukaszewski et al., 2011; Theys et al., 2011).

### Sexual Dimorphisms: An Open Question

A major finding of this study is the appearance of sexual dimorphisms on the effects of maternal caloric restriction in the adult offspring. Differences extend not only to metabolic parameters and gene expression but also to behavioral responses. A major issue in sex differences is the need for control the estrous phase on which the evaluations were performed in order to clarify the impact of sex hormones variations in the female. Since the number of animals needed to control the three phases of the estrous cycle, including morning to afternoon time variations, was too high to be affordable, we had to use randomly cycling female animals sacrificed only during the morning time. This limitation has to be considered in the interpretation of the data and further research will be addressed to evaluate the reasons for the sex-dimorphic alterations. However, it is important to note that in the female rat, sex steroids regulate both the expression and function of the endogenous cannabinoid system, so a potential explanation will also involve the impact of malnutrition on this important modulatory system, as it was described previously (Bonnin et al., 1993; Rodríguez de Fonseca et al., 1994).

### CONCLUSION

As conclusion, our results demonstrated that the exposure to a moderate maternal restricted diet from the preconceptional period predisposed for the development of features related to the

metabolic syndrome, affected subtly the feeding behavior and altered the gene expression of relevant regulators of the lipid and cholesterol metabolism, including the endocannabinoid signaling system, in metabolically-relevant tissues (hypothalamus, liver and PAT) of adult offspring in a sex specific-manner. Moreover, the outcomes of the present study enhance the importance of the periconceptual period as well as the role of maternal diet in the early life programming, due to the fact that the maternal undernutrition was implemented before mating and offspring were raised in an *ad libitum* standard feeding. Importantly, this evidence supports the idea that the contribution of the endocannabinoid system in the early life programming could be critical. Our findings represent an important key point to understand the complexity of the fetal programming process and might be particularly useful in the searching of efficient therapies against a malprogramming. Further studies should be performed to clarify the role of the endocannabinoid system and other homeostatic mechanisms implicated in the process of nutritional programming.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

FR, JS, and RG conceived the study and got financial support. MTRL, MV, RNB, and FA did the animal experiments and

sampling. RA, JD, PR, and JS did both, the biochemical and statistical analysis. MTRL, JS, and FR wrote the first draft of the manuscript that was revised by all authors.

## FUNDING

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad co-funded by UE-ERDF program (CP12/03109 and PI16/01374 to JS, PI12/02261 to FR, and PSI-2012-35388 to RG), Red de Trastornos Adictivos (RD12/0028/0001 to FR), CIBERobn, Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía, UE/ERDF (PI45403, CTS-8221, CTS-433 to FR), Consejería de Salud, Junta de Andalucía, UE/ERDF (SAS111224 to JS and FR. MTRL has been funded by a FPU predoctoral fellowship of the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (AP-2009-0225); JS holds a “Miguel Servet” research contract from the National System of Health, ISCIII (grant number CP12/03109).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2016.00241/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Ahmad, S., Kumar, K. A., Basak, T., Bhardwaj, G., Yadav, D. K., Lalitha, A., et al. (2013). PPAR signaling pathway is a key modulator of liver proteome in pups born to vitamin B(12) deficient rats. *J. Proteomics* 91, 297–308. doi: 10.1016/j.jprot.2013.07.027
- Ahmadi, S. A., Boroumand, M. A., Gohari-Moghaddam, K., Tajik, P., and Dibaj, S. M. (2008). The impact of low serum triglyceride on LDL-cholesterol estimation. *Arch. Iran. Med.* 11, 318. doi: 08113/AIM.0014
- Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., et al. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120, 1640–1645. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644
- Artmann, A., Petersen, G., Hellgren, L. I., Boberg, J., Skonberg, C., Nellemann, C., et al. (2008). Influence of dietary fatty acids on endocannabinoid and N-acyl ethanolamine levels in rat brain, liver and small intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 1781, 200–212. doi: 10.1016/j.bbali.2008.01.006
- Auwerx, J. (1999). PPARgamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 42, 1033–1049. doi: 10.1007/s001250051268
- Barker, D. J. (2007). The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 261, 412–417. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x
- Barker, D. J., Hales, C. N., Fall, C. H., Osmond, C., Phipps, K., and Clark, P. M. (1993). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36, 62–67. doi: 10.1007/BF00399095
- Barker, D. J., and Osmond, C. (1988). Low birth weight and hypertension. *BMJ* 297, 134–135. doi: 10.1136/bmj.297.6641.134-b
- Barker, D. J., Winter, P. D., Osmond, C., Margetts, B., and Simmonds, S. J. (1989). Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 2, 577–580. doi: 10.1016/S0140-6736(89)90710-1
- Bellinger, L., and Langley-Evans, S. C. (2005). Fetal programming of appetite by exposure to a maternal low-protein diet in the rat. *Clin. Sci.* 109, 413–420. doi: 10.1042/CS20050127
- Bellinger, L., Lilley, C., and Langley-Evans, S. C. (2004). Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. *Br. J. Nutr.* 92, 513–520. doi: 10.1079/BJN20041224
- Bello, N. T., Coughlin, J. W., Redgrave, G. W., Ladenheim, E. E., Moran, T. H., and Guarda, A. S. (2012). Dietary conditions and highly palatable food access alter rat cannabinoid receptor expression and binding density. *Physiol. Behav.* 105, 720–726. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.09.021
- Berger, A., Crozier, G., Bisogno, T., Cavaliere, P., Innis, S., and Di Marzo, V. (2001). Anandamide and diet: inclusion of dietary arachidonate and docosahexaenoate leads to increased brain levels of the corresponding N-acyl ethanolamines in piglets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6402. doi: 10.1073/pnas.101119098
- Bispham, J., Gardner, D. S., Gnanalingham, M. G., Stephenson, T., Symonds, M. E., and Budge, H. (2005). Maternal nutritional programming of fetal adipose tissue development: differential effects on messenger ribonucleic acid abundance for uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated and prolactin receptors. *Endocrinology* 146, 3943–3949. doi: 10.1210/en.2005-0246
- Blenck, C. L., Harvey, P. A., Reckelhoff, J. F., and Leinwand, L. A. (2016). The importance of biological sex and estrogen in rodent models of cardiovascular health and disease. *Circ. Res.* 118, 1294–1312. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.307509
- Bonnin, A., Ramos, J. A., Rodríguez de Fonseca, F., Cebeira, M., and Fernández-Ruiz, J. J. (1993). Acute effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on tuberoinfundibular dopamine activity, anterior pituitary sensitivity to dopamine and prolactin release vary as a function of estrous cycle. *Neuroendocrinology* 58, 280–286. doi: 10.1159/000126551
- Brand, T., Spanagel, R., and Schneider, M. (2012). Decreased reward sensitivity in rats from the Fischer344 strain compared to Wistar rats is paralleled by differences in endocannabinoid signaling. *PLoS ONE* 7:e31169. doi: 10.1371/journal.pone.0031169
- Breton, C., Lukaszewski, M. A., Risold, P. Y., Enache, M., Guillemot, J., Rivière, G., et al. (2009). Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E462–E472. doi: 10.1152/ajpendo.90740.2008
- Cardinal, P., Bellocchio, L., Clark, S., Cannich, A., Klugmann, M., Lutz, B., et al. (2012). Hypothalamic CB1 cannabinoid receptors regulate energy balance in mice. *Endocrinology* 153, 4136–4143. doi: 10.1210/en.2012-1405

- Cleal, J. K., Poore, K. R., Boullin, J. P., Khan, O., Chau, R., Hambidge, O., et al. (2007). Mismatched pre- and postnatal nutrition leads to cardiovascular dysfunction and altered renal function in adulthood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 9529–9533. doi: 10.1073/pnas.0610373104
- Clegg, D. J., Brown, L. M., Woods, S. C., and Benoit, S. C. (2006). Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes* 55, 978–987. doi: 10.2337/diabetes.55.04.06.db05-1339
- Clegg, D. J., Riedy, C. A., Smith, K. A., Benoit, S. C., and Woods, S. C. (2003). Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes* 52, 682–687. doi: 10.2337/diabetes.52.3.682
- Cristino, L., Becker, T., and Di Marzo, V. (2014). Endocannabinoids and energy homeostasis: an update. *Biofactors* 40, 389–397. doi: 10.1002/biof.1168
- Das, U. N. (2010). Obesity: genes, brain, gut, and environment. *Nutrition* 26, 459–473. doi: 10.1016/j.nut.2009.09.020
- Decara, J. M., Romero-Cuevas, M., Rivera, P., Macías-González, M., Vida, M., Pavón, F. J., et al. (2012). Elaidyl-sulfamide, an oleoylethanolamide-modelled PPARalpha agonist, reduces body weight gain and plasma cholesterol in rats. *Dis. Model. Mech.* 5, 660–670. doi: 10.1242/dmm.009233
- Desai, M., Babu, J., and Ross, M. G. (2007a). Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R2306–R2314. doi: 10.1152/ajpregu.00783.2006
- Desai, M., Gayle, D., Babu, J., and Ross, M. G. (2005). Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, R91–R96. doi: 10.1152/ajpregu.00340.2004
- Desai, M., Gayle, D., Babu, J., and Ross, M. G. (2007b). The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196, 555.e1–555.e7. doi: 10.1016/j.ajog.2006.11.036
- Deshmukh, R. R., and Sharma, P. L. (2012). Stimulation of accumbens shell cannabinoid CB(1) receptors by noladin ether, a putative endocannabinoid, modulates food intake and dietary selection in rats. *Pharmacol. Res.* 66, 276–282. doi: 10.1016/j.phrs.2012.06.004
- Di Marzo, V., Goparaju, S. K., Wang, L., Liu, J., Bátkai, S., Jári, Z., et al. (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410, 822–825. doi: 10.1038/35071088
- Di Marzo, V., and MacCarrone, M. (2008). FAAH and anandamide: is 2-AG really the odd one out? *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 229–233. doi: 10.1016/j.tips.2008.03.001
- Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Katona, L., Sensi, S. L., et al. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10819–10824. doi: 10.1073/pnas.152334899
- DiPatrizio, N. V., and Simansky, K. J. (2008). Activating parabrachial cannabinoid CB1 receptors selectively stimulates feeding of palatable foods in rats. *J. Neurosci.* 28, 9702–9709. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1171-08.2008
- Droste, S. M., Saland, S. K., Schlitter, E. K., and Rodefer, J. S. (2010). AM 251 differentially affects food-maintained responding depending on food palatability. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95, 443–448. doi: 10.1016/j.pbb.2010.03.005
- Easter, A., Bye, A., Taborrelli, E., Corfield, F., Schmidt, U., Treasure, J., et al. (2013). Recognising the symptoms: how common are eating disorders in pregnancy? *Eur. Eat. Disord. Rev.* 21, 340–344. doi: 10.1002/erv.2229
- Engeli, S., Lehmann, A. C., Kaminski, J., Haas, V., Janke, J., Zoerner, A. A., et al. (2014). Influence of dietary fat intake on the endocannabinoid system in lean and obese subjects. *Obesity (Silver Spring)* 22, E70–E76. doi: 10.1002/oby.20728
- Friedman, J. M., and Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763–770. doi: 10.1038/27376
- García, A. P., Palou, M., Priego, T., Sánchez, J., Palou, A., and Picó, C. (2010). Moderate caloric restriction during gestation results in lower arcuate nucleus NPY- and alphaMSH-neurons and impairs hypothalamic response to fed/fasting conditions in weaned rats. *Diabetes Obes. Metab.* 12, 403–413. doi: 10.1111/j.1463-1326.2009.01174.x
- Geurts, L., Everard, A., Van Hul, M., Essaghir, A., Duparc, T., Matamoros, S., et al. (2015). Adipose tissue NAPE-PLD controls fat mass development by altering the browning process and gut microbiota. *Nat. Commun.* 6, 6495. doi: 10.1038/ncomms7495
- Gluckman, P. D., and Hanson, M. A. (2004). The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 183–187. doi: 10.1016/j.tem.2004.03.002
- Grooten, I. J., Painter, R. C., Pontesilli, M., van der Post, J. A., Mol, B., van Eijsden, M., et al. (2015). Weight loss in pregnancy and cardiometabolic profile in childhood: findings from a longitudinal birth cohort. *BJOG* 122, 1664–1673. doi: 10.1111/1471-0528.13042
- Haas, M. J., Mazza, A. D., Wong, N. C., and Mooradian, A. D. (2012). Inhibition of apolipoprotein A-I gene expression by obesity-associated endocannabinoids. *Obesity (Silver Spring)* 20, 721–729. doi: 10.1038/oby.2011.323
- Hales, C. N., and Barker, D. J. (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *Br. Med. Bull.* 60, 5–20. doi: 10.1093/bmb/60.1.5
- Heyne, A., Kiesselbach, C., Sahún, I., McDonald, J., Gaiffi, M., Dierssen, M., et al. (2009). An animal model of compulsive food-taking behaviour. *Addict. Biol.* 14, 373–383. doi: 10.1111/j.1369-1600.2009.00175.x
- Jimenez-Chillaron, J. C., Hernandez-Valencia, M., Reamer, C., Fisher, S., Joszi, A., Hirshman, M., et al. (2005). Beta-cell secretory dysfunction in the pathogenesis of low birth weight-associated diabetes: a murine model. *Diabetes* 54, 702–711. doi: 10.2337/diabetes.54.3.702
- Keimpema, E., Calvigioni, D., and Harkany, T. (2013). Endocannabinoid signals in the developmental programming of delayed-onset neuropsychiatric and metabolic illnesses. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1569–1576. doi: 10.1042/BST20130117
- Keimpema, E., Hökfelt, T., Harkany, T., and Doherty, P. (2014). The molecular interplay between endocannabinoid and neurotrophin signals in the nervous system and beyond. *Eur. J. Neurosci.* 39, 334–343. doi: 10.1111/ejn.12431
- Lagisz, M., Blair, H., Kenyon, P., Uller, T., Raubenheimer, D., and Nakagawa, S. (2014). Transgenerational effects of caloric restriction on appetite: a meta-analysis: meta-analysis of maternal effects. *Obes. Rev.* 15, 294–309. doi: 10.1111/obr.12138
- Linna, M. S., Raevuori, A., Haukka, J., Suvisaari, J. M., Suokas, J. T., and Gissler, M. (2014). Pregnancy, obstetric, and perinatal health outcomes in eating disorders. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 211, 392.e1–392.e8. doi: 10.1016/j.ajog.2014.03.067
- Liu, J., Dong, H., Zhang, Y., Cao, M., Song, L., Pan, Q., et al. (2015). Bilirubin increases insulin sensitivity by regulating cholesterol metabolism, adipokines and PPARgamma levels. *Sci. Rep.* 5:9886. doi: 10.1038/srep09886
- Lucas, A. (1991). Programming by early nutrition in man. *Ciba Found. Symp.* 156, 38–50. discussion: 50–55.
- Lukaszewski, M. A., Mayeur, S., Fajardy, I., Delahaye, F., Dutriez-Casteloot, I., Montel, V., et al. (2011). Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301, E548–E559. doi: 10.1152/ajpendo.00011.2011
- Lussana, F., Painter, R. C., Ocke, M. C., Buller, H. R., Bossuyt, P. M., and Roseboom, T. J. (2008). Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 1648–1652. doi: 10.3945/ajcn.2008.26140
- Maccarrone, M., Guzmán, M., MacKie, K., Doherty, P., and Harkany, T. (2014). Programming of neural cells by (endo)cannabinoids: from physiological rules to emerging therapies. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 786–801. doi: 10.1038/nrn3846
- Manuel-Apolinar, L., Rocha, L., Damasio, L., Tesoro-Cruz, E., and Zarate, A. (2014). Role of prenatal undernutrition in the expression of serotonin, dopamine and leptin receptors in adult mice: implications of food intake. *Mol. Med. Rep.* 9, 407–412. doi: 10.3892/mmr.2013.1853
- Martínez, D., Pentinat, T., Ribó, S., Daviaud, C., Bloks, V. W., Cebriá, J., et al. (2014). *In utero* undernutrition in male mice programs liver lipid metabolism in the second-generation offspring involving altered Lxra DNA methylation. *Cell Metab.* 19, 941–951. doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.026
- Mathes, C. M., Ferrara, M., and Rowland, N. E. (2008). Cannabinoid-1 receptor antagonists reduce caloric intake by decreasing palatable diet selection in a novel dessert protocol in female rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R67–R75. doi: 10.1152/ajpregu.00150.2008
- Matias, I., Léonhardt, M., Lesage, J., De Petrocellis, L., Dupouy, J. P., Vieau, D., et al. (2003). Effect of maternal under-nutrition on pup body weight and hypothalamic endocannabinoid levels. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 382–389. doi: 10.1007/s000180300031
- McClintock, M. K. (1978). Estrous synchrony and its mediation by airborne chemical communication (*Rattus norvegicus*). *Horm. Behav.* 10, 264–275. doi: 10.1016/0018-506X(78)90071-5

- McClintock, M. K. (1984). Estrous synchrony: modulation of ovarian cycle length by female pheromones. *Physiol. Behav.* 32, 701–705. doi: 10.1016/0031-9384(84)90181-1
- Melis, M., Pistis, M., Perra, S., Muntoni, A. L., Pillolla, G., and Gessa, G. L. (2004). Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors. *J. Neurosci.* 24, 53–62. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4503-03.2004
- Minnich, A., Tian, N., Byan, L., and Bilder, G. (2001). A potent PPARalpha agonist stimulates mitochondrial fatty acid beta-oxidation in liver and skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E270–E279.
- Nicholas, L. M., Rattanarat, L., MacLaughlin, S. M., Ozanne, S. E., Kleemann, D. O., Walker, S. K., et al. (2013). Differential effects of maternal obesity and weight loss in the periconceptional period on the epigenetic regulation of hepatic insulin-signaling pathways in the offspring. *FASEB J.* 27, 3786–3796. doi: 10.1096/fj.13-227918
- Nijland, M. J., Mitsuya, K., Li, C., Ford, S., McDonald, T. J., Nathanielsz, P. W., et al. (2010). Epigenetic modification of fetal baboon hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase following exposure to moderately reduced nutrient availability. *J. Physiol.* 588, 1349–1359. doi: 10.1113/jphysiol.2009.184168
- Niki, M., Jyotaki, M., Yoshida, R., Yasumatsu, K., Shigemura, N., DiPatrizio, N. V., et al. (2015). Modulation of sweet taste sensitivities by endogenous leptin and endocannabinoids in mice. *J. Physiol.* 593, 2527–2545. doi: 10.1113/JP.270295
- Odegaard, J. I., Ricardo-Gonzalez, R. R., Goforth, M. H., Morel, C. R., Subramanian, V., Mukundan, L., et al. (2007). Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447, 1116–1120. doi: 10.1038/nature05894
- Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Bátkai, S., et al. (2005). Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* 115, 1298–1305. doi: 10.1172/JCI200523057
- Palou, M., Konieczna, J., Torrens, J. M., Sánchez, J., Priego, T., Fernandes, M. L., et al. (2012). Impaired insulin and leptin sensitivity in the offspring of moderate caloric-restricted dams during gestation is early programmed. *J. Nutr. Biochem.* 23, 1627–1639. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.11.005
- Palou, M., Priego, T., Sánchez, J., Palou, A., and Picó, C. (2010). Sexual dimorphism in the lasting effects of moderate caloric restriction during gestation on energy homeostasis in rats is related with fetal programming of insulin and leptin resistance. *Nutr. Metab. (Lond.)* 7:69. doi: 10.1186/1743-7075-7-69
- Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Amsterdam: Elsevier- Academic Press.
- Peleg-Raibstein, D., Luca, E., and Wolftrum, C. (2012). Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. *Behav. Brain Res.* 233, 398–404. doi: 10.1016/j.bbr.2012.05.027
- Peregoy, P. L., Zimmermann, R. R., and Strobel, D. A. (1972). Protein preference in protein-malnourished monkeys. *Percept. Mot. Skills* 35, 495–503. doi: 10.2466/pms.1972.35.2.495
- Pettus, J. P., Geist, C. R., and Schultz, G. E. (1974). Recovery from malnutrition: food preference and neophobia. *Percept. Mot. Skills* 38, 767–773. doi: 10.2466/pms.1974.38.3.767
- Poore, K. R., Boullin, J. P., Cleal, J. K., Newman, J. P., Noakes, D. E., Hanson, M. A., et al. (2010). Sex- and age-specific effects of nutrition in early gestation and early postnatal life on hypothalamo-pituitary-adrenal axis and sympathoadrenal function in adult sheep. *J. Physiol.* 588, 2219–2237. doi: 10.1113/jphysiol.2010.187682
- Ramírez-López, M. T., Vázquez, M., Bindila, L., Lomazzo, E., Hofmann, C., Blanco, N., et al. (2016). Maternal caloric restriction implemented during the preconceptional and pregnancy period alters hypothalamic and hippocampal endocannabinoid levels at birth and induces overweight and increased adiposity at adulthood in male rat offspring. *Front. Behav. Neurosci.* 10:208. doi: 10.3389/fnbeh.2016.00208
- Reynolds, C. M., Li, M., Gray, C., and Vickers, M. H. (2014). Early-life growth hormone treatment to offspring of undernourished mothers alters metabolic parameters in primary adipocytes in adulthood. *Growth Factors* 32, 34–40. doi: 10.3109/08977194.2013.870169
- Rodríguez de Fonseca, F., Cebreira, M., Ramos, J. A., Martín, M., and Fernández-Ruiz, J. J. (1994). Cannabinoid receptors in rat brain areas: sexual differences, fluctuations during estrous cycle and changes after gonadectomy and sex steroid replacement. *Life Sci.* 54, 159–170. doi: 10.1016/0024-3205(94)00585-0
- Roseboom, T., de Rooij, S., and Painter, R. (2006). The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum. Dev.* 82, 485–491. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2006.07.001
- Routh, V. H., Hao, L., Santiago, A. M., Sheng, Z., and Zhou, C. (2014). Hypothalamic glucose sensing: making ends meet. *Front. Syst. Neurosci.* 8:236. doi: 10.3389/fnsys.2014.00236
- Sasaki, T. (2015). Age-associated weight gain, leptin, and SIRT1: a possible role for hypothalamic SIRT1 in the prevention of weight gain and aging through modulation of leptin sensitivity. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 6:109. doi: 10.3389/fendo.2015.00109
- Sebert, S. P., Hyatt, M. A., Chan, L. L., Patel, N., Bell, R. C., Keisler, D., et al. (2009). Maternal nutrient restriction between early and midgestation and its impact upon appetite regulation after juvenile obesity. *Endocrinology* 150, 634–641. doi: 10.1210/en.2008-0542
- Seoane-Collazo, P., Ferno, J., Gonzalez, F., Dieguez, C., Leis, R., Nogueiras, R., et al. (2015). Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine* 50, 276–291. doi: 10.1007/s12020-015-0658-y
- Soria-Gomez, E., Massa, F., Bellocchio, L., Rueda-Orozco, P. E., Ciofi, P., Cota, D., et al. (2014). Cannabinoid type-1 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibit stimulated food intake. *Neuroscience* 263, 46–53. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.01.005
- Suzuki, M., Shibamura, M., and Kimura, S. (2010). Effect of severe maternal dietary restriction on growth and intra-abdominal adipose tissue weights in offspring rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 56, 293–298. doi: 10.3177/jnsv.56.293
- Tarrade, A., Panchenko, P., Junien, C., and Gabory, A. (2015). Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism. *J. Exp. Biol.* 218, 50–58. doi: 10.1242/jeb.110320
- Taschler, U., Radner, F. P., Heier, C., Schreiber, R., Schweiger, M., Schoiswohl, G., et al. (2011). Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 286, 17467–17477. doi: 10.1074/jbc.M110.215434
- Thanos, P. K., Ramalhete, R. C., Michaelides, M., Piyis, Y. K., Wang, G. J., and Volkow, N. D. (2008). Leptin receptor deficiency is associated with upregulation of cannabinoid 1 receptors in limbic brain regions. *Synapse* 62, 637–642. doi: 10.1002/syn.20531
- Theys, N., Ahn, M. T., Bouckennooghe, T., Reusens, B., and Remacle, C. (2011). Maternal malnutrition programs pancreatic islet mitochondrial dysfunction in the adult offspring. *J. Nutr. Biochem.* 22, 985–994. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.08.015
- Tibirica, E. (2010). The multiple functions of the endocannabinoid system: a focus on the regulation of food intake. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2:5. doi: 10.1186/1758-5996-2-5
- Tourino, C., Oveisi, F., Lockney, J., Piomelli, D., and Maldonado, R. (2010). FAAH deficiency promotes energy storage and enhances the motivation for food. *Int. J. Obes. (Lond.)* 34, 557–568. doi: 10.1038/ijo.2009.262
- Vaag, A. A., Grunnet, L. G., Arora, G. P., and Brons, C. (2012). The thrifty phenotype hypothesis revisited. *Diabetologia* 55, 2085–2088. doi: 10.1007/s00125-012-2589-y
- Verty, A. N., Stefanidis, A., McAinch, A. J., Hryciw, D. H., and Oldfield, B. (2015). Anti-obesity effect of the CB2 receptor agonist JWH-015 in diet-induced obese mice. *PLoS ONE* 10:e0140592. doi: 10.1371/journal.pone.0140592
- Vickers, M. H., Breier, B. H., Cutfield, W. S., Hofman, P. L., and Gluckman, P. D. (2000). Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, E83–E87.
- Vujic, N., Schlager, S., Eichmann, T. O., Madreiter-Sokolowski, C. T., Goeritzer, M., Rainer, S., et al. (2016). Monoglyceride lipase deficiency modulates endocannabinoid signaling and improves plaque stability in ApoE-knockout mice. *Atherosclerosis* 244, 9–21. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.109
- Wagner, E. J. (2016). Sex differences in cannabinoid-regulated biology: a focus on energy homeostasis. *Front. Neuroendocrinol.* 40, 101–109. doi: 10.1016/j.yfrne.2016.01.003
- Warnick, G. R., Knopp, R. H., Fitzpatrick, V., and Branson, L. (1990). Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clin. Chem.* 36, 15–19.



- Yura, S., Itoh, H., Sagawa, N., Yamamoto, H., Masuzaki, H., Nakao, K., et al. (2005). Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab.* 1, 371–378. doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.005
- Zhang, S., Morrison, J. L., Gill, A., Rattanaray, L., MacLaughlin, S. M., Kleemann, D., et al. (2013). Maternal dietary restriction during the periconceptional period in normal-weight or obese ewes results in adrenocortical hypertrophy, an up-regulation of the JAK/STAT and down-regulation of the IGF1R signaling pathways in the adrenal of the postnatal lamb. *Endocrinology* 154, 4650–4662. doi: 10.1210/en.2013-1414

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

*Copyright © 2016 Ramírez-López, Arco, Decara, Vázquez, Rivera, Blanco, Alén, Gómez de Heras, Suárez and Rodríguez de Fonseca. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.*

## 1.2.2 Datos complementarios al artículo 3

En este apartado se exponen las tablas que aparecen en el **artículo 3** como material suplementario. Específicamente, se denominan **table S1**, **table S2**, **table S3** y **table S4**.

**Table S1.** Primer references for TaqMan® Gene Expression Assays (ThermoFisher)

Gene description	Assay ID	N° accession GenBank	Amplicon length
<i>Actb</i> (beta actin)	Rn00667869_m1	NM_031144.2	91
<i>Gapdh</i> (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)	Rn01775763_g1	NC_005103.4	174
<i>Cnr1</i> (cannabinoid receptor type 1)	Rn02758689_s1	NM_012784.4	92
<i>Cnr2</i> (cannabinoid receptor type 2)	Rn03993699_s1	NM_001164142.1	102
<i>Napepld</i> (N-acyl phosphatidyl ethanolamine phospholipase D)	Rn01786262_m1	NM_199381.1	71
<i>Faah</i> (fatty acid amide hydrolase)	Rn00577086_m1	NM_024132.3	63
<i>Dagla</i> (diacylglycerol lipase, alpha)	Rn01454304_m1	NM_001005886.1	67
<i>Daglb</i> (diacylglycerol lipase, beta)	Rn01453770_m1	NM_001107120.1	57
<i>Mgl1</i> (monoglyceride lipase)	Rn00593297_m1	NM_138502.2	78
<i>Chrebp</i> (carbohydrate-responsive element-binding protein, <i>Mlxip1</i> )	Rn00591943_m1	NM_133552.1	84
<i>Acaca</i> (acetyl-CoA carboxylase alpha)	Rn00573474_m1	NM_022193.1	60
<i>Fasn</i> (fatty acid synthase)	Rn01463550_m1	NM_017332.1	148
<i>Scd1</i> (stearoyl-Coenzyme A desaturase 1)	Rn00594894_g1	NM_139192.2	86
<i>Cpt1a</i> (carnitine palmitoyltransferase 1a, liver)	Rn00580702_m1	NM_031559.2	64
<i>Cpt1b</i> (carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle)	Rn00682395_m1	NC_005106.4	83
<i>Acox1</i> (acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl)	Rn01460628_m1	NM_017340.2	63
<i>Ppara</i> (peroxisome proliferator activated receptor alpha)	Rn00566193_m1	NM_013196.1	98
<i>Pparγ</i> (peroxisome proliferator activated receptor gamma)	Rn00440945_m1	NC_005103.4	105
<i>Srebp1</i> (sterol regulatory element binding transcription factor 1)	Rn01495769_m1	XM_213329.5	79
<i>Srebp2</i> (sterol regulatory element binding transcription factor 2)	Rn01502638_m1	NM_001033694.1	61
<i>Insig1</i> (insulin induced gene 1)	Rn00574380_m1	NM_022392.1	68
<i>Insig2</i> (insulin induced gene 2)	Rn00710111_m1	NM_178091.4	89
<i>Hmgcr</i> (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase)	Rn00565598_m1	NM_013134.2	71
<i>Ucp1</i> (uncoupling protein 1)	Rn00562126_m1	NM_001033694.1	69
<i>Cox4i1</i> (cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1)	Rn00665001_g1	NC_005118.4	72

**Table S2.** Interaction and effects of prenatal diet and sex on the gene expression of relevant ECS components (see Figure 4)<sup>†</sup>

Hypothalamus	Interaction	Prenatal diet	Sex
<i>Cnr1</i>	ns	F(1,23)=11.82	ns
<i>Cnr2</i>	ns	F(1,23)=10.23	ns
<i>Napepld</i>	ns	ns	ns
<i>Faah</i>	ns	ns	ns
<i>Dagla</i>	ns	ns	ns
<i>Daglb</i>	ns	ns	ns
<i>Mgll</i>	ns	ns	F(1,23)=4.87
Liver	Interaction	Prenatal diet	Sex
<i>Cnr1</i>	F(1,22)=15.32	F(1,22)=19.73	F(1,22)=21.46
<i>Cnr2</i>	ns	ns	F(1,22)=28.77
<i>Napepld</i>	ns	F(1,21)=8.02	F(1,21)=5.53
<i>Faah</i>	ns	F(1,22)=7.40	F(1,22)=6.51
<i>Dagla</i>	ns	ns	ns
<i>Daglb</i>	ns	F(1,21)=5.05	ns
<i>Mgll</i>	F(1,22)=9.50	F(1,22)=20.88	(1,22)=22.23
PAT	Interaction	Prenatal diet	Sex
<i>Cnr1</i>	ns	ns	F(1,23)=5.62
<i>Cnr2</i>	ns	F(1,22)=5.04	F(1,22)=7.46
<i>Napepld</i>	ns	F(1,23)=13.67	ns
<i>Faah</i>	F(1,23)=6.92	F(1,23)=16.84	F(1,23)=8.69
<i>Dagla</i>	F(1,23)=5.87	F(1,23)=11.90	F(1,23)=16.86
<i>Daglb</i>	F(1,18)=7.73	F(1,18)=13.07	F(1,18)=9.76
<i>Mgll</i>	ns	F(1,22)=6.20	F(1,22)=6.06

<sup>†</sup>Two-way ANOVA

**Table S3.** Interaction and effects of prenatal diet and sex on the gene expression of relevant components and regulators of lipid and cholesterol metabolism (see Figure 5)<sup>†</sup>

	<b>Liver</b>	<b>Interaction</b>	<b>Prenatal diet</b>	<b>Sex</b>
<i>Chrebp</i>		ns	ns	F(1,21)=8.96
<i>Acaca</i>		F(1,22)=22.48	F(1,22)=27.74	F(1,22)=19.50
<i>Fasn</i>		F(1,22)=5.35	F(1,22)=4.84	ns
<i>Scd1</i>		ns	ns	ns
<i>Cpt1a</i>		ns	F(1,21)=9.10	ns
<i>Acox1</i>		F(1,22)=4.58	F(1,22)=8.48	F(1,22)=5.06
<i>Srebf1</i>		ns	ns	F(1,22)=6.91
<i>Srebf2</i>		ns	ns	F(1,22)=6.90
<i>Insig1</i>		F(1,22)=28.23	F(1,22)=21.77	F(1,22)=15.08
<i>Insig2</i>		ns	ns	F(1,22)=6.24
<i>Hmgcr</i>		ns	F(1,21)=6.71	F(1,21)=6.19
	<b>PAT</b>	<b>Interaction</b>	<b>Prenatal diet</b>	<b>Sex</b>
<i>Chrebp</i>		ns	F(1,23)=4.81	ns
<i>Acaca</i>		ns	ns	ns
<i>Fasn</i>		ns	ns	ns
<i>Scd1</i>		F(1,23)=10.03	F(1,23)=9.21	F(1,23)=8.77
<i>Cpt1b</i>		F(1,23)=24.07	F(1,23)=13.12	F(1,23)=28.66
<i>Acox1</i>		ns	F(1,23)=12.09	ns
<i>Ucp1</i>		ns	ns	ns
<i>Cox4il</i>		ns	F(1,23)=18.83	F(1,23)=19.29

<sup>†</sup>Two-way ANOVA

**Table S4.** Interaction and effects of prenatal diet and sex on the gene expression of *Ppara* and *Pnary* (see Figure 6)<sup>†</sup>

	<b>Liver</b>	<b>Interaction</b>	<b>Prenatal diet</b>	<b>Sex</b>
<i>z</i>		F(1,22)=7.92	ns	F(1,22)=5.69
<i>y</i>		ns	F(1,22)=5.92	F(1,22)=19.88
	<b>PAT</b>	<b>Interaction</b>	<b>Prenatal diet</b>	<b>Sex</b>
<i>z</i>		ns	ns	ns
<i>y</i>		F(1,22)=9.42	F(1,22)=27.48	F(1,22)=17.89

2-way ANOVA



## 1.3 Efecto de la restricción calórica materna implementada durante la totalidad de la gestación: Impacto en los niveles de endocannabinoides al nacimiento

### 1.3.1 Artículo 4

*A moderate diet restriction during pregnancy alters the levels of endocannabinoids and endocannabinoid-related lipids in the hypothalamus, hippocampus and olfactory bul of rat offspring in a sex-specific manner.*

En este artículo se muestra el **impacto de una dieta materna restringida al 20%, implementada durante la totalidad de la gestación**, en los niveles **cerebrales de endocannabinoides y lípidos reslacionados de las crías machos y hembras**, concretamente en hipotálamo, hipocampo y bulbo olfatorio. Se evalúa además en las madres, a lo largo de la gestación, la ingesta calórica y la ganancia de peso. Se analizan los resultados neonatales, concretamente el peso al nacimiento y el tamaño de la camada. Se muestra por primera vez cómo los niveles de endocannabinoides y/o lípidos relacionados en el hipotálamo, hipocampo y bulbo oflatorio son susceptibles de modificarse tras la exposición a una dieta materna moderada, de forma diferencial según el sexo. Se discute además, sobre la vinculación del bajo peso de las crías y los niveles alterados de endocannabinoides en las distintas estructuras cerebrales, con el posible desarrollo de patologías metabólicas y trastornos conductuales en etapas posteriores de la vida.

RESEARCH ARTICLE

# A moderate diet restriction during pregnancy alters the levels of endocannabinoids and endocannabinoid-related lipids in the hypothalamus, hippocampus and olfactory bulb of rat offspring in a sex-specific manner

María Teresa Ramírez-López<sup>1</sup>, Mariam Vázquez<sup>1,2</sup>, Ermelinda Lomazzo<sup>3</sup>,  
Clementine Hofmann<sup>3</sup>, Rosario Noemí Blanco<sup>1</sup>, Francisco Alén<sup>1</sup>, María Antón<sup>1</sup>,  
Juan Decara<sup>2</sup>, Rocío Arco<sup>2</sup>, Laura Orio<sup>1</sup>, Juan Suárez<sup>2,4</sup>, Beat Lutz<sup>3</sup>, Raquel Gómez de  
Heras<sup>1\*</sup>, Laura Bindila<sup>3‡</sup>, Fernando Rodríguez de Fonseca<sup>1,2‡\*</sup>

**1** Departamento de Psicobiología. Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid. Campus de Somosaguas s/n, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain, **2** IBIMA, Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga, Universidad de Málaga, Málaga, Spain, **3** Institute of Physiological Chemistry, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University of Mainz, Mainz, Germany, **4** Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. IBIMA. Facultad de Ciencias, Universidad de Malaga. Campus de Teatinos s/n, Malaga, Spain

‡ These authors are shared senior authors on this work  
\* fernando.rodriguez@ibima.eu (FRF); rgomezhe@psi.ucm.es (RGH)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Ramírez-López MT, Vázquez M, Lomazzo E, Hofmann C, Blanco RN, Alén F, et al. (2017) A moderate diet restriction during pregnancy alters the levels of endocannabinoids and endocannabinoid-related lipids in the hypothalamus, hippocampus and olfactory bulb of rat offspring in a sex-specific manner. PLoS ONE 12(3): e0174307. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174307>

**Editor:** Cristina Óvilo, INIA, SPAIN

**Received:** September 22, 2016

**Accepted:** March 7, 2017

**Published:** March 27, 2017

**Copyright:** © 2017 Ramírez-López et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad (PI12/02261 and PI16/11698 to FRF, PI16/01374 and CP12/03109 to JS, and PSI-2012-35388 to RGH), Red de Trastornos Adictivos UE/ERDF (RD12/0028/0001 to FRF), CIBERobn,

## Abstract

Undernutrition during pregnancy has been associated to increased vulnerability to develop metabolic and behavior alterations later in life. The endocannabinoid system might play an important role in these processes. Therefore, we investigated the effects of a moderate maternal calorie-restricted diet on the levels of the endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol (2-AG), arachidonic acid (AA) and the N-acyl ethanolamines (NAEs) anandamide (AEA), oleoylethanolamide (OEA) and palmitoylethanolamide (PEA) in the brain of newborn rat offspring. We focused on brain structures involved in metabolism, feeding behavior, as well as emotional and cognitive responses. Female Wistar rats were assigned during the entire pregnancy to either control diet (C) or restriction diet (R), consisting of a 20% calorie-restricted diet. Weight gain and caloric intake of rat dams were monitored and birth outcomes were assessed. 2-AG, AA and NAE levels were measured in hypothalamus, hippocampus and olfactory bulb of the offspring. R dams displayed lower gain weight from the middle pregnancy and consumed less calories during the entire pregnancy. Offspring from R dams were underweight at birth, but litter size was unaffected. In hypothalamus, R male offspring displayed decreased levels of AA and OEA, with no change in the levels of the endocannabinoids 2-AG and AEA. R female exhibited decreased 2-AG and PEA levels. The opposite was found in the hippocampus, where R male displayed increased 2-AG and AA levels, and R female exhibited elevated levels of AEA, AA and PEA. In the olfactory bulb, only R female presented decreased levels of AEA, AA and PEA. Therefore, a moderate diet restriction during the entire pregnancy alters differentially the endocannabinoids



Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía, UE/ERDF (PI45403, CTS-8221, CTS-433 to FRF), Consejería de Salud, Junta de Andalucía (SAS111224 to FRF), and the German Research Foundation DFG (FOR926, project CP1 to BL; CRC1080, subproject B08 to BL). MTRL has been funded by a FPU predoctoral fellowship of the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (AP-2009-0225); JS holds "Miguel Servet" research contract from the National System of Health, ISCIII (grant numbers CP12/03109). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

and/or endocannabinoid-related lipids in hypothalamus and hippocampus of the underweight offspring, similarly in both sexes, whereas sex-specific alterations occur in the olfactory bulb. Consequently, endocannabinoid and endocannabinoid-related lipid signaling alterations might be involved in the long-term and sexual dimorphism effects commonly observed after undernutrition and low birth weight.

## Introduction

Decades ago, Barker and colleagues demonstrated a strong and paradoxical correlation between low birth weight and the development of metabolic syndrome in adulthood [1]. Simultaneously, Dutch Famine cohort studies showed the long-lasting and deleterious effects of undernutrition during early development [2]. These investigations led to propose the DOHaD (Developmental origin of Health and Disease) hypothesis, stating that early life insults could lead to increased vulnerability to develop diseases later in life [1] through a process known as programming [3]. Extensive investigations in this area have focused on the effects of undernutrition in the fetal period. Particularly, it has been shown that poor nutritional environment in pregnancy is commonly associated to low birth weight, and to the development of metabolic diseases, such as obesity and metabolic syndrome [1], whose prevalence is reaching epidemic proportions worldwide [4].

Currently, although overnutrition is much more common in developed countries, the consequences of undernutrition in critical windows of development represent still a burden. For instance, for women in rich societies, the pressure of being fit and thin may lead to gain less weight than recommended, increasing the risk to deliver a baby small for his gestational age [5, 6]. Similarly, women with a past of eating disorders are at high risk for suffering preterm birth and intrauterine growth restriction fetuses [7]. Despite the risk of metabolic diseases, underweight at birth has been associated to behavioral abnormalities, including alterations in cognitive performance, inadequate emotional responses or modifications in feeding behavior [8–10]. Therefore, this evidence emphasizes the importance to approach the burden of fetal undernutrition from different perspectives.

The effects of malnutrition during critical windows of human development by using animal models mostly focused on investigating metabolic and/or behavioral alterations [11–14]. Similarly to human studies, investigations using different animal species, but predominantly rodents, have demonstrated that the phenotype exhibited by offspring following undernutrition in utero may depend on the sex [11, 15–17] but also on the developmental stage where undernutrition occurs [2, 18–20]. Furthermore and importantly, the research using animal models has highlighted the underlying mechanisms leading to inadequate programming, showing alterations in brain structures involved in metabolism, learning and emotional processes after exposure to fetal undernutrition. For instance, the impairment of hypothalamic circuitry development, intimately connected to modifications in leptin signaling, has been described in animal models of intrauterine growth restriction [21, 22]. Moreover, dysregulation in hippocampal circuitries associated to BDNF (brain-derived neurotrophic factor) alterations in specific developmental stages has also been reported in offspring, either after exposure to a maternal calorie-restricted diet [23] or low dietary intake of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) during pregnancy and lactation [24].

Closely related to leptin signaling and BDNF [25, 26], the endocannabinoid system (ECS), a lipid signaling system, has emerged as a putative modulator of the biological mechanisms involved in developmental programming [27]. Indeed, the ECS has been demonstrated to be

crucial for regulating energy balance and food intake via central and peripheral mechanisms [28], as well as for the control of emotional responses and learning [29]. Consequently, ECS dysregulation has been associated to the development of obesity, metabolic syndrome and neuropsychiatric disorders [30, 31], which are diseases that might occur as a result of inadequate early life programming [1, 2, 8–13, 15–17, 20], as mentioned above. In addition to the endocannabinoids, non-cannabinoid acylethanolamines (OEA, PEA) that shares biosynthetic and degradation enzymatic pathways with anandamide, also contribute to the control of appetite, weight gain and lipid metabolism [28, 31, 32]

The main endocannabinoids anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), are synthesized from phospholipids containing arachidonic acid (AA), which is a linoleic acid derivative [32] and belongs to the n-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA) family. Noteworthy, several investigations have revealed the importance of PUFAs in brain development. For instance, a negative correlation between n-3 PUFA intake and increased vulnerability to neuropsychiatric disorders has been shown [33–36]. The role of n-6 PUFAs, precursors of arachidonic acid and ultimately of endocannabinoids, has been pointed out as critical in these processes as well [33, 37]. Specifically, endocannabinoid signaling plays a crucial role in important processes involved in brain maturation, including the establishment of adequate neural connections and synaptogenesis [33, 38]. Moreover, prenatal administration either of agonists, such as THC ( $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol), or antagonists of cannabinoid receptors, has been associated to disruption of neuronal activity, defective establishment of cortical connectivity and behavioral abnormalities [39–43].

Although less investigated, altered nutritional conditions during early life might also have an impact on endocannabinoid signaling, leading to disturbances in brain functions and/or behaviors. Thus, prenatal and postnatal exposure to restricted omega-3 diet has been associated to impaired endocannabinoid-mediated neuronal functions in the adult brain, together with behavioral abnormalities [36]. Moreover, exposure to a maternal diet rich in n-3 or n-6 fatty acids modifies arachidonic acid and/or endocannabinoid levels in neonatal hypothalamus and hippocampus, resulting in alterations in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis functions [44]. Therefore, this piece of evidence suggests that an inadequate endocannabinoid signaling resulting from exposure to an unbalanced maternal diet, might disrupt the establishment of functional circuitries involved in metabolism, learning and emotional control, leading to metabolic and neurobehavioral abnormalities later in life [27].

To date, only a few studies have addressed the relation between a global undernutrition in early life and endocannabinoid signaling. For instance, a pioneer study demonstrated modifications in the levels of endocannabinoids at weaning after maternal exposure to a calorie-restricted diet during pregnancy and/or lactation [45]. However, the impact of nutrient deficiency in earlier stages has been poorly investigated. Addressing this question could be especially pertinent considering that endocannabinoid levels fluctuate strongly during early development [46], which suggests a potentially critical contribution of endocannabinoid signaling in the earliest neural development processes. Accordingly, we have recently showed that exposure to a hypocaloric maternal diet implemented before and during gestation has an impact on the brain endocannabinoids and endocannabinoid-related lipids, leading to long-lasting consequences in offspring [47].

Taking into account that the timing of caloric restriction could be critical on the effects exhibited by offspring [2, 18–20] and that these effects might be sex-dependent [11, 15–17], this study aims at investigating the impact of a moderate caloric restriction applied during the entire pregnancy on male and female newborn rats. Particularly, we measured at birth the endocannabinoid, arachidonic acid and N-acylethanolamines (NAEs) content in brain structures involved in the modulation of metabolism, feeding behavior, learning and emotional responses, such as hypothalamus, hippocampus and olfactory bulb [28, 29, 48]. We hypothesize that endocannabinoid

signaling could be impaired in the offspring after exposure to maternal undernutrition during the complete pregnancy in a sex specific-manner.

## Material and methods

This study was approved by the Animal Ethics Committee of the Complutense University of Madrid and was conducted in compliance with the European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and according to the Spanish regulations (RD 53/2013 and 178/2004).

### Animals, diets and experimental design

Adult female Wistar rats (6 months old) (Harlan, Barcelona, Spain) were allowed to acclimate for a minimum of four weeks before the beginning of the experiments. Rats were handled and housed in groups under a 12 hours light-dark cycle with temperature of  $22\pm 1^\circ\text{C}$ . After the acclimation period, animals weighed  $304\pm 4$  g and estrous cycle was evaluated daily. In the morning of proestrous, females were allowed to mate with a male of the same strain. Each male rat was mated with females from both groups (described below). The mating phase lasted 24 hours and occurred in the female cage. In the following morning the presence of vaginal plug or spermatozoa in vaginal smear confirmed successful mating, and this was defined as gestational day 0. Then, female rats were individually housed and randomly assigned to control ( $n = 4$ ) or caloric restriction diet ( $n = 7$ ) groups. At this stage, no statistical significant difference in body weight between groups was found.

Control rats ( $n = 4$ ) were given free access to standard chow (Standard chow SAFE A04, Panlab, Barcelona, Spain). The standard chow provided 16.1% protein, 60% carbohydrate, 3.1% fat, 4% fiber, 0.0025% sodium and 2.9 kcal/g as energy content. In contrast, calorie-restricted dams ( $n = 7$ ) were given a daily amount of food corresponding to 80% of the calories provided to control rats in the same gestational day, according to body weight (20% of caloric restriction). Water was provided ad libitum in both animal groups.

The day the dams were found with their respective litter was defined as postnatal 0 (PNO). Within 14 hours after birth, pups were weighed, sexed and sacrificed by quick decapitation. Brains were collected and brain regions were dissected for endocannabinoids measurement. None of the animals utilized in the present study showed signs of illness or died prior to the experimental endpoint.

### Endocannabinoids and endocannabinoid related-lipids measurement

At PNO, male offspring chosen to be sacrificed were decapitated during the second/third hour of the dark phase and brains were quickly removed and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until brain region dissection. To avoid the possibility of variable outcomes among litters, brains from at least three litters per group were used to carry out endocannabinoids and endocannabinoid related lipid measurement (control male pups,  $n = 14-14-12$  and male pups from calorie-restricted group,  $n = 14-18-14$ , for hypothalamus, hippocampus and olfactory bulb respectively; control female pups,  $n = 10-9-9$  and female pups from calorie-restricted group,  $n = 10-10-10$ , for hypothalamus, hippocampus and olfactory bulb respectively). For the isolation of the selected brain regions, brains were thawed in cold Tris-HCl buffer (50 mM, pH = 7.4) and the entire hypothalamus, right hippocampus and right olfactory bulb was quickly dissected and immediately frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until lipid extraction. The overall dissection procedure was carried out in less than 7 minutes for all animals to allow reliable comparative assessment of endocannabinoid levels.

For lipid extraction, pre-cooled steel balls of 5 mm were added to pre-cooled tubes containing the tissue. A solution of deuterated endocannabinoids (AEA-d4, 2-AG-d5, AA-d8, MAEA,

OEA-d2, PEA-d4 and 1-AG-d5, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) in acetonitrile was added to the tissue along with 300  $\mu$ L of ice-cold 0.1 M formic acid and 300  $\mu$ L of ethylacetate/hexane (9:1, v/v). Then, the samples were homogenized with a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) for 60 s at 30 Hz. Subsequently, the samples were centrifuged for 10 min at 5,000 g and 4°C and frozen at -20°C for 20 min. The organic phase was removed and evaporated under a gentle stream of nitrogen at 37°C. The aqueous phase was further used for protein content determination. The lipid extract was resolubilized in 50- $\mu$ L acetonitrile/water (1:1, v/v) and quantitative analysis of the endocannabinoid levels was carried out by liquid chromatography-multiple reaction monitoring (LC-MRM). The concentrations of internal standards, as well as the calibration curves, were set and tailored using test hypothalamus, hippocampal and olfactory bulb tissues. The LC/MRM conditions for quantitative analysis of the endocannabinoids were set as previously described [49]. For protein quantification, the BCA method (bicinchoninic acid assay) was used and measurements were performed by using a FLUOstar Galaxy (BMG Labtechnologies). The endocannabinoid levels determined by LC/MRM were then normalized to the corresponding protein content of the tissues as previously described [49–51].

### Statistical analysis

Caloric intake and body weight gain over time of rat dams were analyzed by two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA), with time and pregnancy diet as factors. Multiple comparisons were assessed by Bonferroni post hoc test. Further analysis were performed by using the Student's *t*-test, when data passed the normality requirements (D'Agostini Pearson test), or Mann-Whitney's U test. A *p*-value below 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Impact of a moderate caloric restriction during gestation on rat dams

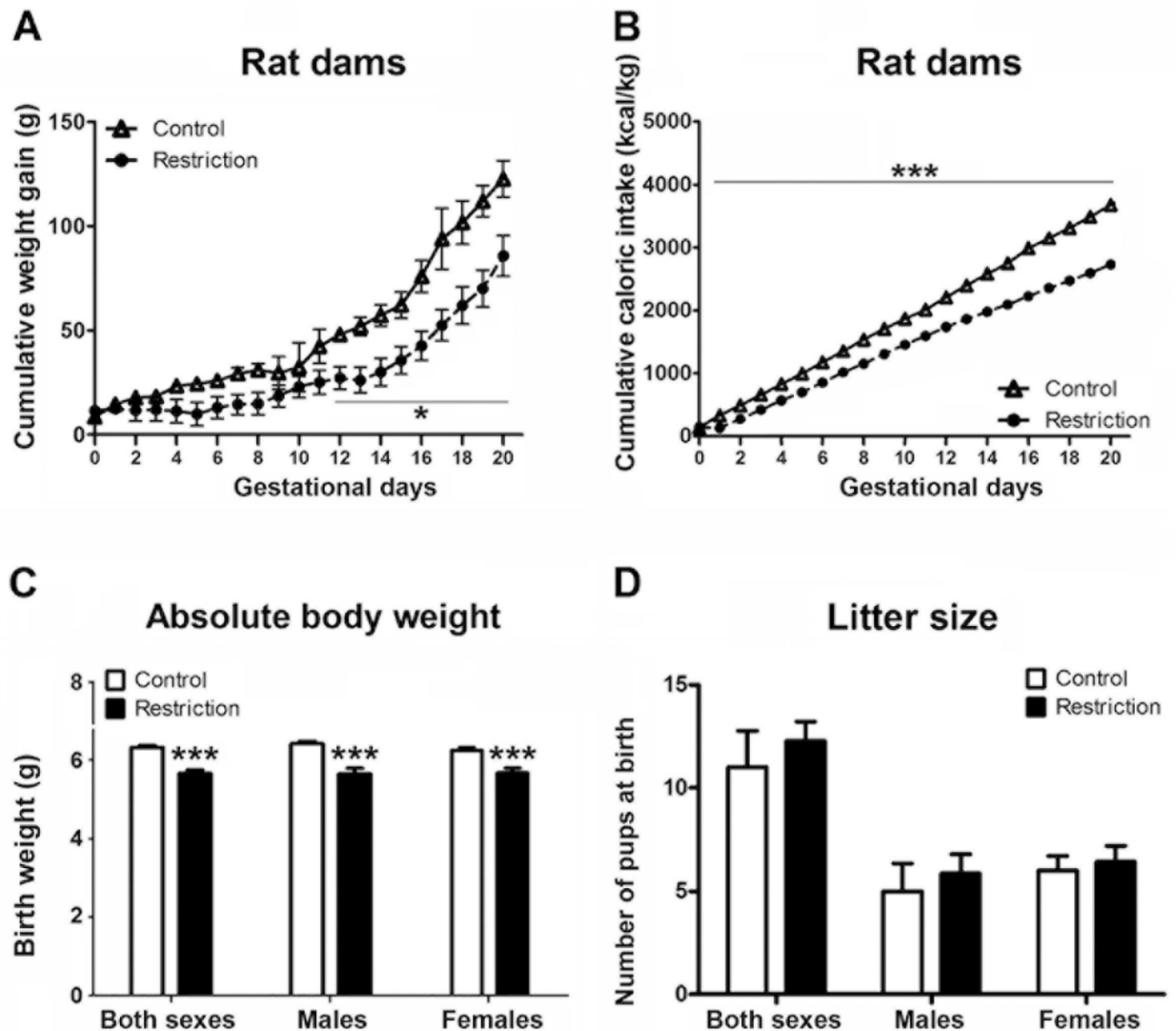
**Effect of a moderate gestational restriction diet on maternal weight gain.** Repeated measures ANOVA showed decreased cumulated weight gain in calorie-restricted dams as compared to controls during the entire pregnancy ( $F_{(1,9)} = 5.7$ ,  $p < 0.05$ ). Specifically, Bonferroni multiple comparisons showed that statistically significant differences between groups started at gestational day 12 ( $F_{(1,9)} = 7.78$ ,  $p < 0.05$ ) and lasted up to day 20 ( $F_{(1,9)} = 6.40$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig 1A and S1 Data). Moreover, at PN0, calorie-restricted mothers weighed significantly less than controls (mean weight and SEMs of controls vs calorie-restriction: 342.1 9.38 vs 303.2 9.82, Mann-Whitney's U test,  $U(4,7) = 3$ ,  $p < 0.05$ ) (data not shown).

**Effect of a moderate gestational restriction diet on maternal caloric intake.** According to the experimental design carried out, the cumulative caloric intake of calorie-restricted dams was decreased (repeated measures ANOVA,  $F_{(1,9)} = 184.51$ ,  $p < 0.001$ ). Statistically significant differences between groups started at gestational day 1 ( $F_{(1,9)} = 53.08$ ,  $p < 0.001$ ) and lasted up to the end of measurements (day 20) ( $F_{(1,9)} = 169.53$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig 1B).

Taken together these data indicate that calorie-restricted diet has an impact on weight gain and absolute body weight during pregnancy. Moreover, taking into account the experimental design adopted in the present study, calorie-restricted dams consumed less calories as compared to controls.

### Effect of a moderate maternal caloric restriction on birth outcomes

Pups from control dams and calorie-restricted mothers were born between gestational day 21–22. At birth, offspring from gestational calorie-restricted dams weighed significantly less



**Fig 1. Effect of gestational calorie-restriction on rat dams and birth outcomes.** Experiments started the following day of mating. Calorie-restricted rat dams ( $n = 7$ ) received 80% of control dams ( $n = 4$ ) food intake according to body weight, which was measured daily (restriction of 20%). Calorie-restricted diet lasted until birth. Figures A and B describe the cumulative weight gain (g) and cumulative caloric intake (Kcal/Kg), respectively, of control (open triangles) and calorie-restricted (solid circles) dams during pregnancy. At PNO (birth day), litter size was evaluated and pups were sexed and weighed. Figures C and D describe the absolute body weight (g) and litter size, respectively, of offspring from control dams ( $n = 30$ ) and offspring from calorie-restricted dams ( $n = 47$ ) at birth (open and solid bars, respectively). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed with repeated measures ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons (A, B), and Student  $t$  test (C, D): \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174307.g001>

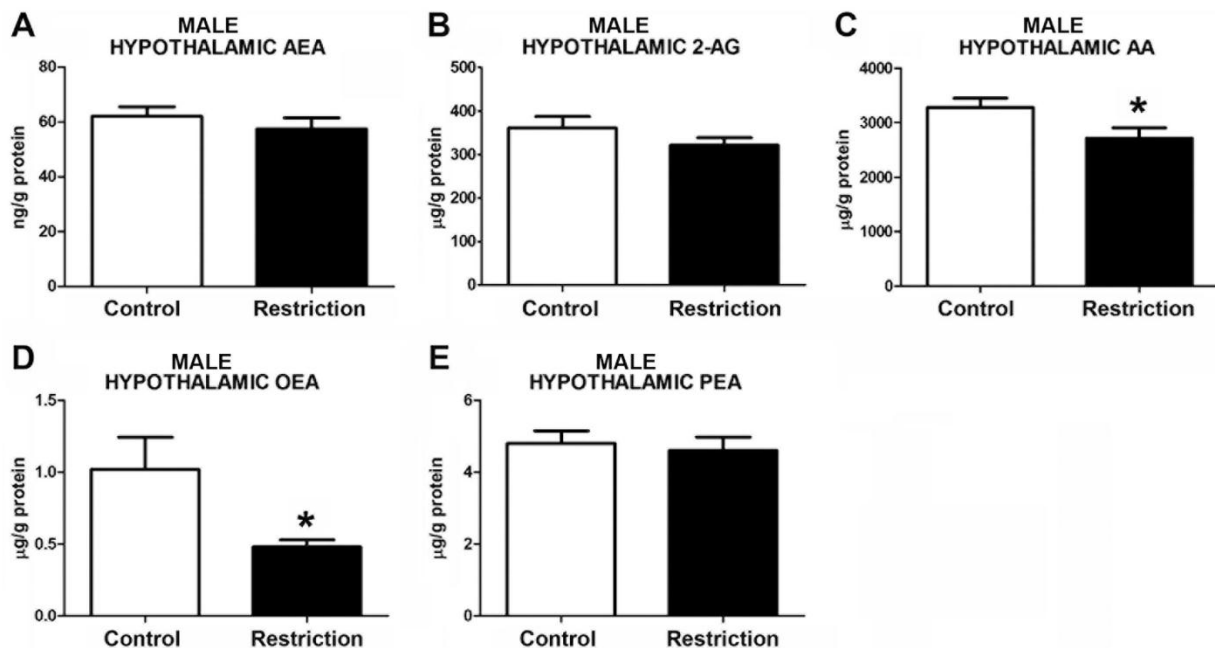
than controls: both sexes taken together ( $t = 6.199$ ,  $p < 0.001$ ); male ( $t = 4.768$ ,  $p < 0.001$ ); female ( $t = 3.997$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig 1C). In contrast, no significant differences in litter size were found either in both sexes analyzed together or in each sex analyzed separately (Fig 1D). Thus, gestational calorie-restriction leads to underweight at birth without modifying the litter size.

## Impact of a moderate maternal caloric restriction on endocannabinoid and endocannabinoid-related lipid levels in specific brain regions of male and female offspring at birth

**Hypothalamic endocannabinoid and endocannabinoid-related lipid levels in male and female offspring at birth.** Statistically significant differences between perinatal groups were found in endocannabinoids and/or endocannabinoid-related lipids at birth in male and female offspring. Specifically, male pups from gestational calorie-restricted dams displayed significant lower levels of AA as compared to controls ( $U = 45.00$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig 2C and S2 Data), but similar levels of AEA ( $t = 0.8515$ ,  $p > 0.05$ ) and 2-AG ( $t = 1.275$ ,  $p > 0.05$ ) (Fig 2A and 2B, respectively). Regarding NAEs levels, offspring from calorie-restricted dams presented lower concentrations of oleoylethanolamide (OEA) ( $U = 46.00$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig 2D), but no significant differences in palmitoylethanolamide (PEA) levels ( $U = 79$ ,  $p > 0.05$ ) (Fig 2E). Female pups exhibited decreased level of 2-AG ( $t = 2.649$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig 3B) but no differences either in AEA or AA ( $U = 42$ ,  $p > 0.05$  and  $U = 36$ , respectively) were found (Fig 3A and 3C). Females also presented a reduction of PEA levels ( $t = 2.197$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig 3D). The OEA values in the hypothalamus could not be reliably quantified in female offspring (data not shown).

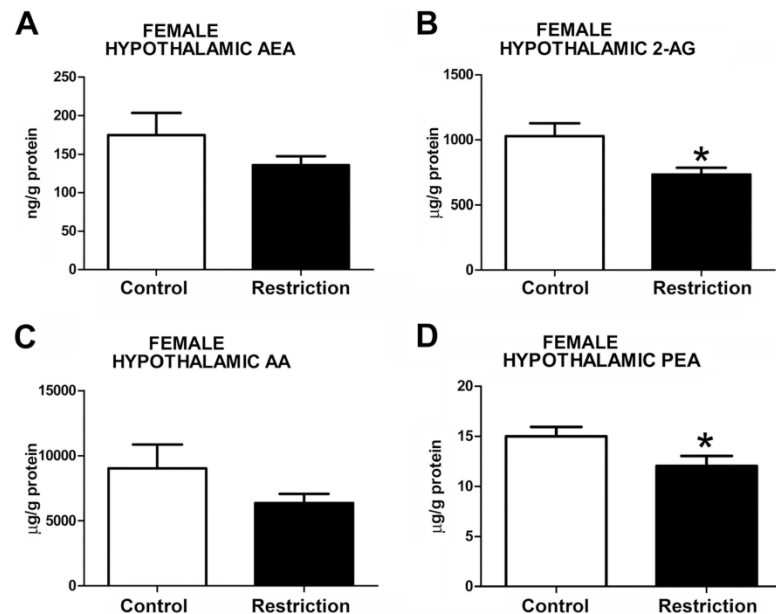
Taken together, these data show that a moderate caloric restriction diet during pregnancy decreases hypothalamic content of the endocannabinoid and/or the endocannabinoid-related lipids in the offspring with sex-dependent differences.

**Hippocampal endocannabinoid and endocannabinoid related-lipid levels in male and female offspring at birth.** Measurements of hippocampal endocannabinoid and endocannabinoid-related lipids showed statistical differences between perinatal groups in both sexes.



**Fig 2. Endocannabinoid and endocannabinoid-related lipid levels in the hypothalamus of male offspring at birth.** Anandamide (AEA), 2-arachidonoylglycerol (2-AG), arachidonic acid (AA), oleoylethanolamide (OEA) and palmitoylethanolamide (PEA) levels in the hypothalamus of male offspring (A-E) from control dams ( $n = 14$ ) and calorie-restricted dams ( $n = 14$ ) at birth (open bars and solid bars, respectively). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed by Student's  $t$ -test (A, B) or Mann Whitney's  $U$  test (C, D, E): \*  $p < 0.05$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174307.g002>



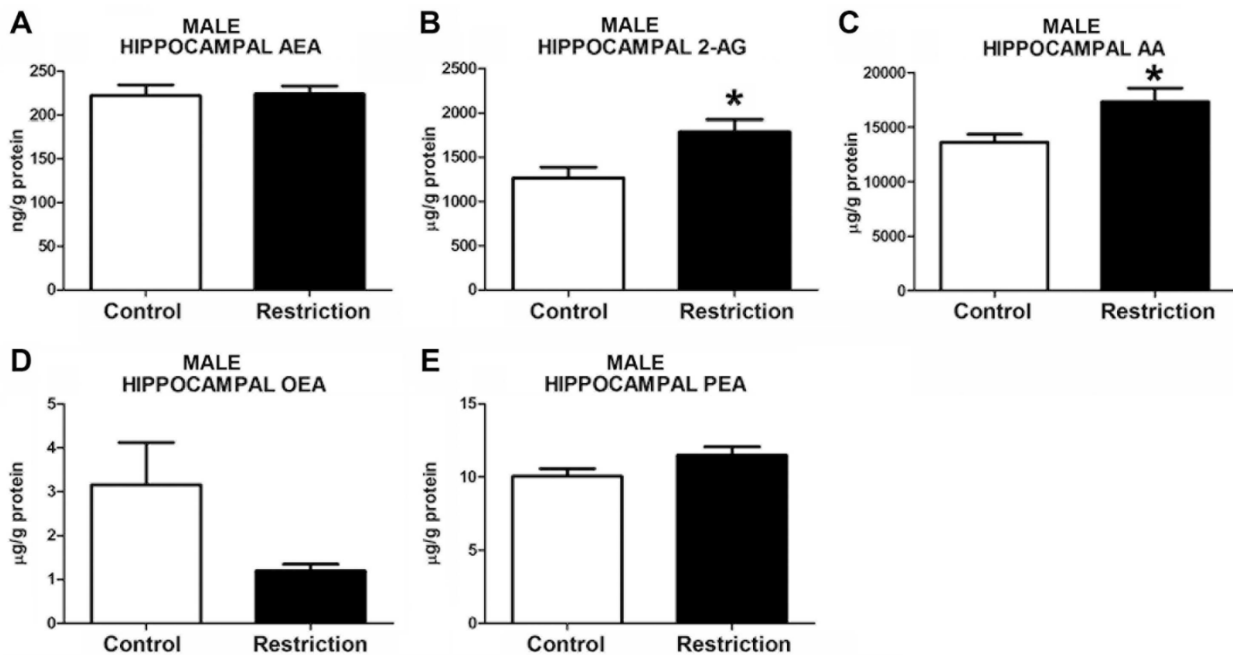
**Fig 3. Endocannabinoid and endocannabinoid-related lipid levels in the hypothalamus of female offspring at birth.** Anandamide (AEA), 2-arachidonoylglycerol (2-AG), arachidonic acid (AA) and palmitoylethanolamide (PEA) levels in the hypothalamus of female offspring (A-D) from control dams (n = 10) and calorie-restricted dams (n = 10) at birth (open bars and solid bars, respectively). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed by Student's *t*-test (B, D) or Mann-Whitney's U test (A, C): \* $p < 0.05$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174307.g003>

Specifically, the male offspring from calorie-restricted dams displayed increased levels of 2-AG ( $t = 2.721$ ,  $p < 0.05$ ) and AA ( $U = 65.00$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig 4B and 4C, respectively, and S3 Data). A strong tendency to increased levels of PEA in calorie-restricted male offspring was also detected ( $t = 1.775$ ,  $p = 0.08$ ) (Fig 4E). However, no differences between groups either in AEA ( $t = 0.1325$ ,  $p > 0.05$ ) or OEA ( $U = 93$ ,  $p > 0.05$ ) levels were found (Fig 4A and 4D, respectively). In contrast, calorie-restricted female pups showed increased hippocampal AEA ( $t = 2.264$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig 5A) and, similarly to male offspring, enhanced levels of AA ( $t = 2.401$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig 5C), although 2-AG levels were unchanged ( $t = 1.489$ ,  $p > 0.05$ ) (Fig 5B). Moreover, female offspring from diet-restricted dams presented higher hippocampal levels of PEA ( $U = 18$ ,  $p < 0.05$ ) than control female pups (Fig 5D). The OEA values in the hippocampus could not be reliably quantified in female offspring (data not shown).

Taken together, these data indicate that a moderate caloric restriction during pregnancy increases the hippocampal endocannabinoids and/or endocannabinoid-related lipids in the offspring with sex-dependent differences.

**Endocannabinoid and endocannabinoid-related lipid levels in the olfactory bulb of male and female offspring at birth.** The statistical analysis did not reveal any alteration in endocannabinoids, such as AEA ( $t = 0.68$ ,  $p > 0.05$ ) and 2-AG ( $U = 75$ ,  $p > 0.05$ ), AA ( $U = 68$ ,  $p > 0.05$ ) and PEA ( $U = 68$ ,  $p > 0.05$ ) levels in the olfactory bulb of male offspring from calorie-restricted dams as compared to controls (Fig 6). In contrast, significant alterations in the endocannabinoid and endocannabinoid-related lipids were detected in female restricted offspring (Fig 7 and S4 Data). Specifically, calorie-restricted females exhibited decreased levels of AEA ( $t = 3.279$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig 7A), AA ( $t = 2.471$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig 7C) and PEA ( $t = 2.639$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig 7D) in this brain structure. No differences were found between groups in the levels of



**Fig 4. Endocannabinoid and endocannabinoid-related lipid levels in the hippocampus of male offspring at birth.** Anandamide (AEA), 2-arachidonoylglycerol (2-AG), arachidonic acid (AA), oleoylethanolamide (OEA) and palmitoylethanolamide (PEA) levels in the hippocampus of male offspring (A-E) from control dams (n = 14) and calorie-restricted dams (n = 18) at birth (open bars and solid bars, respectively). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed by Student's *t*-test (A, B, E) or Mann Whitney's U test (C, D): \**p* < 0.05

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174307.g004>

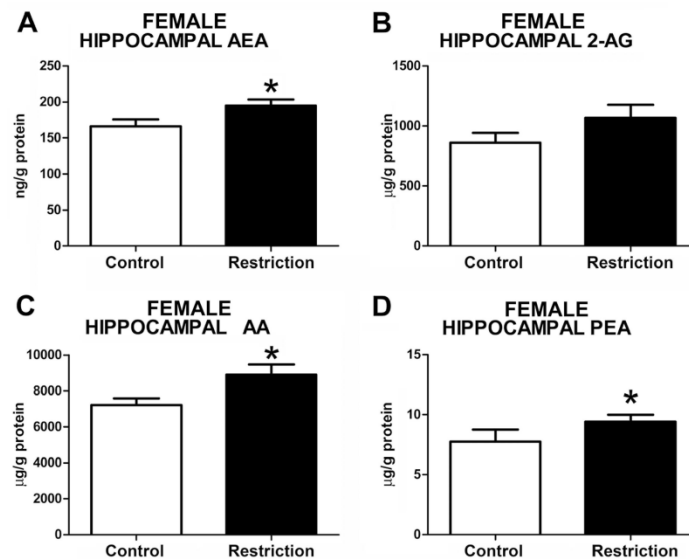
2-AG ( $t = 1.550$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig 7B). The OEA values in the olfactory bulb could not be reliably quantified in both male and female offspring (data not shown).

Taken together, these data indicate that a moderate caloric restriction diet during pregnancy modifies the levels of endocannabinoids and/or endocannabinoid-related lipids in the hypothalamus, hippocampus and/or olfactory bulb of offspring. Specifically, male and female offspring from calorie-restricted dams that were underweight at birth displayed decreased endocannabinoids and endocannabinoids-related lipids in the hypothalamus, whereas the opposite was found in the hippocampus. The female offspring also showed the same tendency as hypothalamus to reduced endocannabinoid and endocannabinoid-related lipids in the olfactory bulb. Importantly, alterations in each endocannabinoid and/or related lipid occurred differently according to the sex of the offspring.

## Discussion

The main finding of the present study is that newborn rats exposed to a moderate caloric restriction during the entire pregnancy displayed alterations in endocannabinoids and/or endocannabinoid-related lipids, in brain structures involved in the regulation of metabolism and emotional and cognitive responses. Specifically, male and female offspring from diet-restricted dams exhibited decreased levels of the main endocannabinoids, their precursor and/or NAEs in the hypothalamus and, conversely, they showed enhanced content of these lipids in the hippocampus. This similar profile between males and females from calorie-restricted dams was not evident in the olfactory bulb, where the calorie-restricted female offspring presented decreased levels of AEA, their precursor (AA) and PEA. Moreover, these modifications





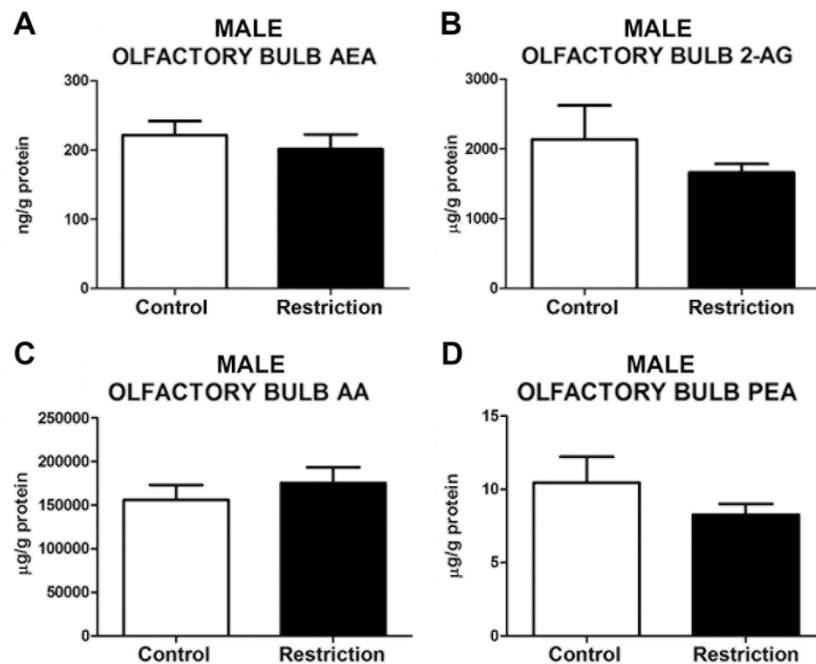
**Fig 5. Endocannabinoid and endocannabinoid-related lipid levels in the hippocampus of female offspring at birth.** Anandamide (AEA), 2-arachidonoylglycerol (2-AG), arachidonic acid (AA), and palmitoylethanolamide (PEA) levels in the hippocampus of female offspring (A-D) from control dams ( $n = 9$ ) and calorie-restricted dams ( $n = 10$ ) at birth (open bars and solid bars, respectively). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed by Student's  $t$ -test (A, B, C) or Mann Whitney's U test (D): \* $p < 0.05$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174307.g005>

were accompanied of underweight at birth, a common result when diet restriction is applied for the entire pregnancy or in the last phases of pregnancy [12, 13]. Interestingly, this finding has been widely associated to metabolic and behavioral abnormalities later in life [12–14].

The majority of animal research conducted to evaluate the effects of undernutrition in critical developmental windows has focused on investigating the deleterious effects of a severe gestational diet restriction in the offspring [12, 13]. In our study, we have adopted a moderate maternal calorie-restriction, that may have simulated better the reduction in food intake documented in some human studies, commonly associated to decreased weight gain during pregnancy [5, 6, 52], and could have prevented unnecessary effects in the animals. In rodents, this type of maternal restriction has been demonstrated previously to be enough to induce long-lasting alterations in offspring [11, 14, 53, 54]. Moreover, we have recently showed that the pre-conceptional and gestational exposure to a moderate calorie-restricted diet increases the risk of developing features of metabolic syndrome as well as behavioral abnormalities in the offspring [47, 55]. Importantly, in the present study, we have demonstrated for the first time that a moderate maternal caloric restriction applied during the entire pregnancy alters brain endocannabinoid and/or endocannabinoid-related lipid levels at birth in male and female offspring and reduces the weight at birth.

The modifications in the supply of nutrients to the fetus may have altered the intrauterine growth leading to inadequate size at birth in our study. Regarding the most important nutrients during intrauterine life, apart from glucose and aminoacids, the fatty acids and, particularly, the long-chain (LC) PUFAs, such as the arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA) has been revealed as critical elements for a correct growth and neurodevelopment [37, 56]. The concentration of LC-PUFAs and their precursor depends on diet, fatty acid storage in the adipose tissue and endogenous synthesis, which requires adequate functionality of the enzymes involved in desaturation and elongation of essential fatty acids [57]. Therefore, to

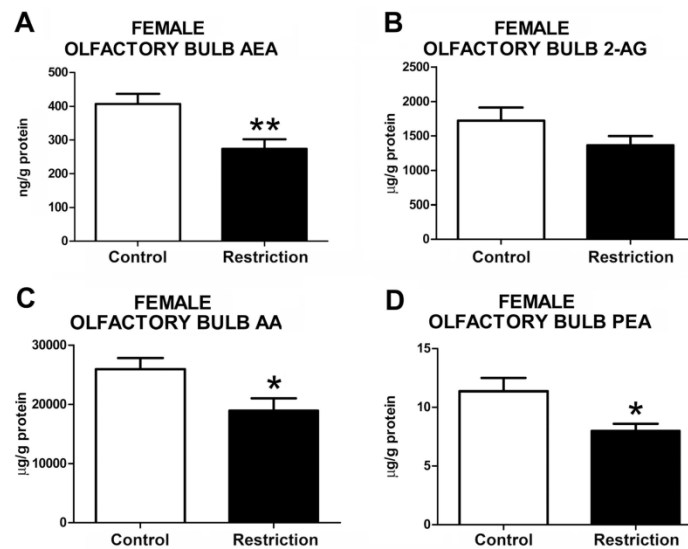


**Fig 6. Endocannabinoid and endocannabinoid-related lipid levels in the olfactory bulb of male offspring at birth.** Anandamide (AEA), 2-arachidonoylglycerol (2-AG), arachidonic acid (AA) and palmitoylethanolamide (PEA) levels in the olfactory bulb of male offspring (A-D) from control dams (n = 12) and calorie-restricted dams (n = 14) at birth (open bars and solid bars, respectively). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed by Student's *t*-test (A) or Mann Whitney's U test (B, C, D): \**p*<0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174307.g006>

ensure an adequate fatty acid supply, the fetuses and new born animals depend on the mother nutritional status and the placenta functionality to obtain both essential fatty acids (EFAs) and long-chain fatty acids (LC-PUFAs). This is due to the limited capacity of the fetus to transform EFAs and the importance of depositing the PUFAs in key tissues, including the fetal brain, during intrauterine growth [57, 58]. Regarding the endocannabinoids, little is known about the fetal-maternal relationship in endocannabinoid content. It has been proposed that, although n-6 PUFA derivatives may be synthesized by the fetus in the tissues, the placenta may also transfer maternal endocannabinoids to the fetus by contributing to maintenance of the endocannabinoid basal tone [27]. Consequently, a maternal caloric restriction in our study may have had an impact on the levels of PUFAs and their derivatives, including the endocannabinoids, in the fetus, and leading to alterations in endocannabinoid and related lipid levels in different brain structures.

Indeed, we found decreased levels of endocannabinoids and/or endocannabinoid-related lipids in the hypothalamus of male and female offspring. Specifically, we found decreased AA levels in the hypothalamus of male offspring, without any change in the concentrations of AA-derived endocannabinoids (i.e., AEA and 2-AG). In contrast, the female offspring exhibited decreased levels of 2-AG in this brain region despite the unchanged concentrations of its precursor (AA). Apart from the reduced concentration of the LC-PUFAs after a caloric restriction, including the reduction of the AA, precursor of endocannabinoids, an alternative explanation to these findings may involve a sex-specific alteration in the activity and/or levels of the endocannabinoid metabolic enzymes. Therefore, in an attempt to maintain endocannabinoid and/or



**Fig 7. Endocannabinoid and endocannabinoid-related lipid levels in the olfactory bulb of female offspring at birth.** Anandamide (AEA), 2-arachidonoylglycerol (2-AG), arachidonic acid (AA) and palmitoylethanolamide (PEA) levels in the olfactory bulb of female offspring (A-D) from control dams ( $n = 9$ ) and calorie-restricted dams ( $n = 10$ ) at birth (open bars and solid bars, respectively). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed by Student's  $t$ -test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174307.g007>

AA homeostasis, an increased synthesis of 2-AG and AEA could have lately determined the reduction of AA in male offspring. Conversely, an increased degradation of 2-AG may have determined its reduction and maintained the AA content in females unchanged. Further analysis of the expression and activity of enzymes responsible for biosynthesis and degradation of endocannabinoids has to be addressed to confirm this hypothesis. Another possibility is that an increased endocannabinoid transfer from mother, through placenta, might have also contributed to maintain an endocannabinoid tone in the hypothalamus of male offspring [27], despite the decreased AA availability and the depletion in maternal tissues due to undernutrition. This idea is supported by previous studies showing differences in male and females placentas after inadequate maternal diets [59, 60].

Our finding in male hypothalamus contrasts with a previous report [45], describing decreased hypothalamic endocannabinoid levels in male offspring coming from dams exposed to a 50% calorie-restricted diet during late pregnancy. However, in this interesting study and differently to ours, the endocannabinoid measurement was performed at weaning, and not at birth. Considering that the pups are independent from the maternal fatty acid stores at this developmental stage, the levels of endocannabinoids here may easily have reflected the metabolic status of the pups and, thus, their own fatty acid stores. Specifically, in this previous study the pups at weaning exhibited decreased body weight that was accompanied by a reduction of hypothalamic AEA. Although the body weight at birth was not reported in this study, similar types of restriction have been associated to decreased body weight at birth, which suggests that these animals did not exhibit a rapid catch-up growth. This phenomenon has been described after caloric restriction in pregnancy and/or small fetuses associated to hyperphagia [12, 13] and is known to induce a severely dysfunctional metabolic phenotype in the offspring later life [13, 61]. Therefore, the decreased hypothalamic anandamide described in the study of Matias et al. (2003) might have affected the appetite [62, 63] in these animals, leading to a lean

phenotype at weaning and favoring complete recovery at adulthood. Although we did not evaluate the long-term effects on the offspring, the opposite might have occurred in our study. Particularly, we found decreased levels of OEA in the hypothalamus of male offspring from calorie-restricted mothers. Considering that this NAE is involved in the modulation of satiety [64], our data suggest a possible increased appetite in these animals, similar to previously reported in offspring exposed to undernutrition in pregnancy and undergoing to rapid catch-up growth during lactation and infant period and impaired metabolic phenotype at adulthood [13, 61].

Moreover, in female hypothalamus we found decreased levels of PEA, a NAE with anti-inflammatory and antiobesity properties [65, 66], suggesting the possibility of inflammatory status in female offspring, which has been associated to the development of metabolic and behavioral abnormalities [67–69].

The reduction of the levels of OEA and PEA in male and female offspring may be a consequence of a limited amount of the precursors required for their synthesis, particularly the oleic acid and/or palmitic acid, as previously proposed in adult animals [70, 71] and recently demonstrated in humans [72]. Additionally, the impairment of the activity and/or levels of the enzymes implicated in the synthesis and degradation of NAEs might also explain these results. Further research is needed to address these possibilities.

Concerning the possible interpretation to our findings in hypothalamus, it is important to note that previous studies have showed that the reduction in both AA and endocannabinoid levels in this brain structure at birth is associated to the development of metabolic disturbances at adulthood [47, 51]. Although alterations in endocannabinoids were not observed in male offspring in this brain region, the decreased levels of AA and their association with decreased birth at weight found in the present study might have promoted adverse consequences in the development of hypothalamus. This supposition takes into account that AA is a LC-PUFA involved in growth and brain development and is the precursor of the eicosanoids, which contribute to regulate cell proliferation, growth, immunity and inflammation [37].

We also evaluated the endocannabinoid levels in the hippocampus, a brain structure involved in modulating emotional responses and where the endocannabinoid system plays an important role in memory formation and neurogenesis associated to metabolism-dependent mechanisms [29, 73]. Intriguingly, we found increased hippocampal levels of AA and 2-AG at birth in male offspring from calorie-restricted dams, which is opposite to the findings in the hypothalamus. In the female hippocampus we also found increased concentration of AEA, AA and PEA levels. The increased endocannabinoid and AA levels found in our animals might reflect a fetal adaptation against the reduced availability of nutrients to preserve hippocampal development. This idea is supported by previous works showing fluctuating BDNF levels, a protein related to endocannabinoids [26], in different stages of the brain development of offspring from severely calorie-restricted dams [23]. Interestingly, a peak in 2-AG levels at PN1 in the whole brain has been described together with increased expression of the cannabinoid receptor type 1 (CB<sub>1</sub>), suggesting the importance of endocannabinoids (i.e., 2-AG) and endocannabinoid synthesis precursors (i.e., AA) for an adequate brain development [46]. Considering this evidence, the increased 2-AG and AA levels at PN0 in male offspring may reflect a premature peak to prevent the deleterious effects on hippocampus development. In female offspring we found increased AEA and PEA levels. It is interesting to note that the enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) degrades both AEA and PEA [74], which suggests that an eventual alteration in this metabolic enzyme may be implicated. Moreover, the increased levels of AA, 2-AG and AEA in male and female offspring suggest that implementing a moderate caloric restriction in rat previously well-nourished might have a modest impact on the fatty acid storage at the beginning of pregnancy, favoring the deposition of AA in hippocampus. In

particular, it is interesting to note that these findings contrast with the results recently described by our group in offspring from mothers exposed to the same caloric restriction during the preconceptual and gestational period, and with presumably decreased maternal stores. In this previous study, we observed decreased levels of AEA in hippocampus at birth in association to increased anxiety-related responses in adolescence [47], suggesting that the potential compensatory effect of increased endocannabinoids in the hippocampus is inverted in worse nutritional conditions. Further research is needed to confirm these possibilities.

Although the role of the endocannabinoid system in behavioral programming has not been well established yet, alterations in hippocampal endocannabinoid content are known to promote impaired emotional and cognitive responses. For instance, a decrease in the hippocampal 2-AG level has been correlated to anxiety-related responses [51, 75, 76], and the blockade of anandamide reuptake specifically in the hippocampus produces anxiolytic effects [77]. Furthermore, increased 2-AG in hippocampus was associated to mitigation of the cognitive alterations in severely undernourished mice supplemented with a diet rich in fish oil, an important source of n-3 PUFAs [78], although the opposite has been described in an animal model of schizophrenia [79]. In the context of nutritional programming, emotional responses and cognitive performance have been found to be affected after exposure to undernutrition during critical windows of development and/or in new born small for gestational age [14, 20, 80] and in a sex specific-manner [81, 82]. Despite this evidence, the increased levels of 2-AG, AEA and AA we found in the hippocampus are difficult to interpret, considering that CB<sub>1</sub> receptor activation by endocannabinoids may mediate bimodal opposite responses depending on the differential distribution of CB<sub>1</sub> in distinct neuronal populations [29].

Additionally, we measured endocannabinoid and NAE levels in the olfactory bulb of male offspring. The contribution of the endocannabinoid system has been revealed recently in this brain structure, where CB<sub>1</sub> receptor stimulation increases odor perception and food intake in fasted animals [48]. In male offspring, we did not detect any modification in the endocannabinoid levels in the olfactory bulb from calorie-restricted dams, even though these animals displayed higher levels of OEA in the hypothalamus, which was probably associated to disrupted hunger and/or feeding behavior in these animals. However and interestingly, the female offspring displayed decreased levels of AEA, AA and PEA in the olfactory bulb, suggesting alterations in feeding behavior and an inflammatory status. The findings in female offspring are in agreement to a previous report showing that prenatal adverse conditions (such as prenatal stress) can affect odor preference in a sex specific-manner, leading to alterations in odor preference in female offspring [83] and suggesting that the females might have increased vulnerability in this brain structure after exposure to adverse perinatal conditions.

The changes in endocannabinoid and/or endocannabinoid-related lipid levels found in the hypothalamus and hippocampus of male and female offspring from calorie-restricted dams raise several questions. On the one hand, as modifications in these lipid regulators were found in developing brain structures in association with decreased weight at birth, we cannot discard the possibility that these alterations might have long-lasting consequences in the offspring, as it has been previously reported [12–14]. Indeed, alterations in endocannabinoid signaling in brain structures involved in the modulation of metabolism and emotional responses may lead to inadequate neuronal wiring or subtle alterations in neuronal connectivity and favor vulnerability to diseases later in life [27]. Moreover, previous studies have shown that alterations in endocannabinoid signaling during early development after treatment with specific agonists/antagonists of the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors are associated to long-lasting neurochemical, endocrine and behavioral effects [39–43]. In support of this notion, we have recently reported changes in brain endocannabinoids and endocannabinoid-related lipids at birth after inadequate maternal diets in hypothalamus and hippocampus in association with metabolic and

behavioral alterations [47, 51]. On the other hand, it is possible that some brain structures were protected from the effects of a moderate caloric restriction implemented only during pregnancy by the preferential uptake of the fetal tissues of specific LC-PUFAs, such as AA or n-3 PUFAs. It is interesting to note here that the n-3 PUFAs can affect the levels of endocannabinoids by decreasing their levels by competing for the metabolic enzymes [70, 84], or by increasing their levels depending on different circumstances [78, 85]. Additionally, the presence of sexual dimorphism mainly associated to the alterations found in olfactory bulb and the PEA levels in all the brain regions of females, suggest that the maternal calorie-restriction might have affected the male and female offspring through different mechanisms. Further investigations are needed to explore these possibilities.

## Conclusions

In summary, we have demonstrated that a moderate caloric restriction during the entire pregnancy results in underweight offspring with altered endocannabinoid, AA and/or NAE levels in the hypothalamus, hippocampus and/or olfactory bulb of male and female offspring at birth in a sex-specific manner. These data represent a first step towards understanding the possible contribution of the ECS in the nutritional programming, considering the available data on the long-lasting effects of undernutrition and underweight at birth. Understanding why dietary manipulations modify hypothalamic, hippocampal and olfactory bulb endocannabinoid and endocannabinoid-related lipid levels, and whether these changes lead to permanent dysfunctions in the ECS and/or impairment in circuitries involved in the regulation of metabolism and emotional behaviors in a sex-specific manner need to be elucidated. Therefore, further investigations are required to clarify the role of the ECS in nutritional programming.

## Supporting information

### S1 Data. Gestation weight gain in rat dams.

(PZF)

### S2 Data. Endocannabinoid and endocannabinoid-related lipid levels in hypothalamus.

(PZF)

### S3 Data. Endocannabinoid and endocannabinoid-related lipid levels in hippocampus.

(PZF)

### S4 Data. Endocannabinoid and endocannabinoid-related lipid levels in olfactory bulb.

(PZF)

## Acknowledgments

The authors thank Claudia Schwitter for her help and support during lipid extraction, BCA analysis and endocannabinoid measurement.

## Author Contributions

**Conceptualization:** FRF LB BL RGH JS.

**Formal analysis:** LB MTRL JS.

**Funding acquisition:** FRF BL LB RGH JS.

**Investigation:** MTRL MV FA JD MA RNB RA EL CH LB LO JS.

**Methodology:** LB MTRL JS FRF BL.

**Writing – original draft:** FRF MTRL.

**Writing – review & editing:** BL JS EL LO RGH LB.

## References

1. Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med.* 2007; 261(5):412–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x> PMID: 17444880
2. Roseboom T, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev.* 2006; 82(8):485–91. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2006.07.001> PMID: 16876341
3. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* 1991; 156:38,50; discussion 50–5.
4. World Health Organization. Global status report of noncommunicable diseases 2014. Geneva: WHO Press, World Health Organization; 2014.
5. DeVader SR, Neeley HL, Myles TD, Leet TL. Evaluation of gestational weight gain guidelines for women with normal prepregnancy body mass index. *Obstet Gynecol.* 2007; 110(4):745–51. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000284451.37882.85> PMID: 17906004
6. Easter A, Bye A, Taborelli E, Corfield F, Schmidt U, Treasure J, et al. Recognising the symptoms: how common are eating disorders in pregnancy?. *Eur Eat Disord Rev.* 2013; 21(4):340–4. <https://doi.org/10.1002/erv.2229> PMID: 23495197
7. Micali N, Simonoff E, Treasure J. Risk of major adverse perinatal outcomes in women with eating disorders. *Br J Psychiatry.* 2007; 190:255–9. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.106.020768> PMID: 17329747
8. Rickards AL, Kelly EA, Doyle LW, Callanan C. Cognition, academic progress, behavior and self-concept at 14 years of very low birth weight children. *J Dev Behav Pediatr.* 2001; 22(1):11–8. PMID: 11265918
9. Nomura Y, Wickramaratne PJ, Pilowsky DJ, Newcorn JH, Bruder-Costello B, Davey C, et al. Low birth weight and risk of affective disorders and selected medical illness in offspring at high and low risk for depression. *Compr Psychiatry.* 2007; 48(5):470–8. <https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2007.04.005> PMID: 17707257
10. Lussana F, Painter RC, Ocke MC, Buller HR, Bossuyt PM, Roseboom TJ. Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88(6):1648–52. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26140> PMID: 19064527
11. Palou M, Priego T, Sanchez J, Palou A, Pico C. Sexual dimorphism in the lasting effects of moderate caloric restriction during gestation on energy homeostasis in rats is related with fetal programming of insulin and leptin resistance. *Nutr Metab (Lond).* 2010; 7:69,7075–7-69.
12. Lukaszewski MA, Mayeur S, Fajardy I, Delahaye F, Dutriez-Casteloot I, Montel V, et al. Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011; 301(3):E548–59. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00011.2011> PMID: 21712534
13. Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 288(1):R91–6. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00340.2004> PMID: 15297266
14. Akitake Y, Katsuragi S, Hosokawa M, Mishima K, Ikeda T, Miyazato M, et al. Moderate maternal food restriction in mice impairs physical growth, behavior, and neurodevelopment of offspring. *Nutr Res.* 2015; 35(1):76–87. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.10.014> PMID: 25433908
15. Suzuki M, Shibamura M, Kimura S. Effect of severe maternal dietary restriction on growth and intra-abdominal adipose tissue weights in offspring rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2010; 56(5):293–8.
16. Desai M, Babu J, Ross MG. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293(6):R2306–14. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00783.2006> PMID: 17898113
17. Aiken CE, Ozanne SE. Sex differences in developmental programming models. *Reproduction.* 2013; 145(1):R1. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0489> PMID: 23081892
18. McMillen IC, Schwartz J, Coulter CL, Edwards LJ. Early embryonic environment, the fetal pituitary-adrenal axis and the timing of parturition. *Endocr Res.* 2004; 30(4):845–50. PMID: 15666835
19. Zhang S, Morrison JL, Gill A, Rattanaraj L, MacLaughlin SM, Kleemann D, et al. Dietary restriction in the periconceptional period in normal-weight or obese ewes results in increased abundance of angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin type 1 receptor (AT1R) in the absence of changes in

- ACE or AT1R methylation in the adrenal of the offspring. *Reproduction*. 2013; 146(5):443–54. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0219> PMID: 24084173
20. Levay EA, Paolini AG, Govic A, Hazi A, Penman J, Kent S. Anxiety-like behaviour in adult rats perinatally exposed to maternal calorie restriction. *Behav Brain Res*. 2008; 191(2):164–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.021> PMID: 18453007
  21. Coupe B, Amarger V, Grit I, Benani A, Parnet P. Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology*. 2010; 151(2):702–13. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0893> PMID: 20016030
  22. Delahaye F, Breton C, Risold P, Enache M, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, et al. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology*. 2008; 149(2):470. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1263> PMID: 18006626
  23. Coupe B, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Lefevre F, Mairesse J, Dickes-Coopman A, et al. Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. *J Neuroendocrinol*. 2009; 21(1):40–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01806.x> PMID: 19094092
  24. Madore C, Nadjar A, Delpech JC, Sere A, Aubert A, Portal C, et al. Nutritional n-3 PUFAs deficiency during perinatal periods alters brain innate immune system and neuronal plasticity-associated genes. *Brain Behav Immun*. 2014; 41:22–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.03.021> PMID: 24735929
  25. Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*. 2001; 410(6830):822–5. <https://doi.org/10.1038/35071088> PMID: 11298451
  26. Keimpema E, Hokfelt T, Harkany T, Doherty P. The molecular interplay between endocannabinoid and neurotrophin signals in the nervous system and beyond. *Eur J Neurosci* 2014; 39(3):334–43. <https://doi.org/10.1111/ejn.12431> PMID: 24494674
  27. Keimpema E, Calvigioni D, Harkany T. Endocannabinoid signals in the developmental programming of delayed-onset neuropsychiatric and metabolic illnesses. *Biochem Soc Trans* 2013; 41(6):1569–76. <https://doi.org/10.1042/BST20130117> PMID: 24256256
  28. Cristino L, Becker T, Di Marzo V. Endocannabinoids and energy homeostasis: an update. *Biofactors* 2014; 40(4):389–97. <https://doi.org/10.1002/biof.1168> PMID: 24752980
  29. Lutz B, Marsicano G, Maldonado R, Hillard CJ. The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nature reviews.Neuroscience*. 2015; 16(12):705–18. <https://doi.org/10.1038/nrn4036> PMID: 26585799
  30. Lutz B. Endocannabinoid signals in the control of emotion. *Curr Opin Pharmacol*. 2009; 9(1):46–52. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.12.001> PMID: 19157983
  31. Tibirica E. The multiple functions of the endocannabinoid system: a focus on the regulation of food intake. *Diabetol Metab Syndr*. 2010; 2:5,5996-2-5. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-2-5> PMID: 20180990
  32. Hansen HS, Artmann A. Endocannabinoids and nutrition. *J Neuroendocrinol*. 2008; 20 Suppl 1:94–9.
  33. Morgese MG, Trabace L. Maternal Malnutrition in the Etiopathogenesis of Psychiatric Diseases: Role of Polyunsaturated Fatty Acids. *Brain Sci*. 2016; 6(3).
  34. Morgese MG, Tucci P, Mhillaj E, Bove M, Schiavone S, Trabace L, et al. Lifelong Nutritional Omega-3 Deficiency Evokes Depressive-Like State Through Soluble Beta Amyloid. *Mol Neurobiol*. 2016.
  35. Larrieu T, Madore C, Joffre C, Laye S. Nutritional n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency alters cannabinoid receptor signaling pathway in the brain and associated anxiety-like behavior in mice. *J Physiol Biochem*. 2012; 68(4):671–81. <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0179-6> PMID: 22707188
  36. Lafourcade M, Larrieu T, Mato S, Duffaud A, Sepers M, Matias I, et al. Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat Neurosci*. 2011; 14(3):345–50. <https://doi.org/10.1038/nn.2736> PMID: 21278728
  37. Hadley KB, Ryan AS, Forsyth S, Gautier S, Salem J, Norman. The Essentiality of Arachidonic Acid in Infant Development. *Nutrients*. 2016; 8(4):216. <https://doi.org/10.3390/nu8040216> PMID: 27077882
  38. Maccarrone M, Guzman M, Mackie K, Doherty P, Harkany T. Programming of neural cells by (endo) cannabinoids: from physiological rules to emerging therapies. *Nat Rev Neurosci*. 2014; 15(12):786–801. <https://doi.org/10.1038/nrn3846> PMID: 25409697
  39. Antonelli T, Tomasini MC, Tattoli M, Cassano T, Tanganelli S, Finetti S, et al. Prenatal exposure to the CB1 receptor agonist WIN 55,212–2 causes learning disruption associated with impaired cortical NMDA receptor function and emotional reactivity changes in rat offspring. *Cereb Cortex*. 2005; 15(12):2013–20. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhi076> PMID: 15788701



40. Bernard C, Milh M, Morozov YM, Ben-Ari Y, Freund TF, Gozlan H. Altering cannabinoid signaling during development disrupts neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(26):9388–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409641102> PMID: 15964987
41. de Salas-Quiroga A, Diaz-Alonso J, Garcia-Rincon D, Remmers F, Vega D, Gomez-Canas M, et al. Prenatal exposure to cannabinoids evokes long-lasting functional alterations by targeting CB1 receptors on developing cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(44):13693–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514962112> PMID: 26460022
42. Rodriguez de Fonseca F, Cebeira M, Fernandez-Ruiz JJ, Navarro M, Ramos JA. Effects of pre- and perinatal exposure to hashish extracts on the ontogeny of brain dopaminergic neurons. *Neuroscience*. 1991; 43(2–3):713–23. PMID: 1922791
43. Moreno M, Escuredo L, Munoz R, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M. Long-term behavioural and neuroendocrine effects of perinatal activation or blockade of CB1 cannabinoid receptors. *Behav Pharmacol*. 2005; 16(5–6):423–30. PMID: 16148447
44. D'Asti E, Long H, Tremblay-Mercier J, Grajzer M, Cunnane SC, Di Marzo V, et al. Maternal dietary fat determines metabolic profile and the magnitude of endocannabinoid inhibition of the stress response in neonatal rat offspring. *Endocrinology*. 2010; 151(4):1685–94. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1092> PMID: 20160134
45. Matias I, Leonhardt M, Lesage J, De Petrocellis L, Dupouy JP, Vieau D, et al. Effect of maternal undernutrition on pup body weight and hypothalamic endocannabinoid levels. *Cell Mol Life Sci*. 2003; 60(2):382–9. PMID: 12678501
46. Berrendero F, Sepe N, Ramos JA, Di Marzo V, Fernandez-Ruiz JJ. Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse*. 1999; 33(3):181–91. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(19990901\)33:3<181::AID-SYN3>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(19990901)33:3<181::AID-SYN3>3.0.CO;2-R) PMID: 10420166
47. Ramirez-Lopez MT, Vazquez M, Bindila L, Lomazzo E, Hofmann C, Blanco RN, et al. Maternal Caloric Restriction Implemented during the Preconceptional and Pregnancy Period Alters Hypothalamic and Hippocampal Endocannabinoid Levels at Birth and Induces Overweight and Increased Adiposity at Adulthood in Male Rat Offspring. *Front Behav Neurosci*. 2016; 10:208. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00208> PMID: 27847471
48. Soria-Gomez E, Bellocchio L, Reguero L, Lepousez G, Martin C, Bendahmane M, et al. The endocannabinoid system controls food intake via olfactory processes. *Nat Neurosci*. 2014; 17(3):407–15. <https://doi.org/10.1038/nn.3647> PMID: 24509429
49. Bindila L, Lutz B. Extraction and Simultaneous Quantification of Endocannabinoids and Endocannabinoid-Like Lipids in Biological Tissues. *Methods Mol Biol*. 2016; 1412:9–18. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3539-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3539-0_2) PMID: 27245887
50. Wenzel D, Matthey M, Bindila L, Lerner R, Lutz B, Zimmer A, et al. Endocannabinoid anandamide mediates hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(46):18710–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308130110> PMID: 24167249
51. Ramirez-Lopez MT, Vazquez M, Bindila L, Lomazzo E, Hofmann C, Blanco RN, et al. Exposure to a Highly Caloric Palatable Diet During Preegestational and Gestational Periods Affects Hypothalamic and Hippocampal Endocannabinoid Levels at Birth and Induces Adiposity and Anxiety-Like Behaviors in Male Rat Offspring. *Front Behav Neurosci*. 2016; 9:339. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00339> PMID: 26778987
52. Micali N, Treasure J, Simonoff E. Eating disorders symptoms in pregnancy: a longitudinal study of women with recent and past eating disorders and obesity. *J Psychosom Res*. 2007; 63(3):297–303. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2007.05.003> PMID: 17719368
53. Garcia AP, Palou M, Priego T, Sanchez J, Palou A, Pico C. Moderate caloric restriction during gestation results in lower arcuate nucleus NPY- and alphaMSH-neurons and impairs hypothalamic response to fed/fasting conditions in weaned rats. *Diabetes Obes Metab*. 2010; 12(5):403–13. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2009.01174.x> PMID: 20415688
54. Garcia AP, Palou M, Sanchez J, Priego T, Palou A, Pico C. Moderate caloric restriction during gestation in rats alters adipose tissue sympathetic innervation and later adiposity in offspring. *PLoS One*. 2011; 6(2):e17313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017313> PMID: 21364997
55. Ramirez-Lopez MT, Arco R, Decara J, Vazquez M, Rivera P, Blanco RN, et al. Long-Term Effects of Prenatal Exposure to Undernutrition on Cannabinoid Receptor-Related Behaviors: Sex and Tissue-Specific Alterations in the mRNA Expression of Cannabinoid Receptors and Lipid Metabolic Regulators. *Front Behav Neurosci*. 2016; 10:241. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00241> PMID: 28082878
56. Cetin I, Alvino G, Cardellicchio M. Long chain fatty acids and dietary fats in fetal nutrition. *J Physiol (Lond)*. 2009; 587(14):3441–51.

57. Amusquivar E, Herrera E. Influence of changes in dietary fatty acids during pregnancy on placental and fetal fatty acid profile in the rat. *Biol Neonate*. 2003; 83(2):136–45.
58. Herrera E. Implications of Dietary Fatty Acids During Pregnancy on Placental, Fetal and Postnatal Development—A Review. *Placenta*. 2002; 23, Supplement A(0):S9–S19.
59. Gallou-Kabani C, Gabory A, Tost J, Karimi M, Mayeur S, Lesage J, et al. Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet. *PLoS One*. 2010; 5(12):e14398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014398> PMID: 21200436
60. Gabory A, Ferry L, Fajardy I, Jouneau L, Gothie JD, Vige A, et al. Maternal diets trigger sex-specific divergent trajectories of gene expression and epigenetic systems in mouse placenta. *PLoS One*. 2012; 7(11):e47986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047986> PMID: 23144842
61. Bieswal F, Ahn MT, Reusens B, Holvoet P, Raes M, Rees WD, et al. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity (Silver Spring)*. 2006; 14(8):1330–43.
62. Williams CM, Kirkham TC. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999; 143(3):315–7.
63. Jamshidi N, Taylor DA. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol*. 2001; 134(6):1151–4. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704379> PMID: 11704633
64. De Fonseca FR, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, et al. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature-London*. 2001:209–11.
65. Hoareau L, Roche R. Palmitoylethanolamide, adipocytes and obesity-related inflammatory states. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 2010; 7(3–4):e205–12.
66. Mattace Raso G, Santoro A, Russo R, Simeoli R, Paciello O, Di Carlo C, et al. Palmitoylethanolamide prevents metabolic alterations and restores leptin sensitivity in ovariectomized rats. *Endocrinology*. 2014; 155(4):1291. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1823> PMID: 24428531
67. Rana JS, Nieuwdorp M, Jukema JW, Kastelein JJP. Cardiovascular metabolic syndrome—an interplay of, obesity, inflammation, diabetes and coronary heart disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2007; 9(3):218–32. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2006.00594.x> PMID: 17391148
68. Bolton JL, Bilbo SD. Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms. *Dialogues Clin Neurosci*. 2014; 16(3):307–20. PMID: 25364282
69. Marques AH, Bjorke-Monsen AL, Teixeira AL, Silverman MN. Maternal stress, nutrition and physical activity: Impact on immune function, CNS development and psychopathology. *Brain Res*. 2015; 1617:28–46. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.051> PMID: 25451133
70. Artmann A, Petersen G, Helligren LI, Boberg J, Skonberg C, Nellemann C, et al. Influence of dietary fatty acids on endocannabinoid and N-acylethanolamine levels in rat brain, liver and small intestine. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1781(4):200–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2008.01.006> PMID: 18316044
71. Hansen HS. Effect of diet on tissue levels of palmitoylethanolamide. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013; 12(1):17–25. PMID: 23394522
72. Pu S, Eck P, Jenkins DJ, Connelly PW, Lamarche B, Kris-Etherton PM, et al. Interactions between dietary oil treatments and genetic variants modulate fatty acid ethanolamides in plasma and body weight composition. *Br J Nutr*. 2016; 115(6):1012–23. <https://doi.org/10.1017/S0007114515005425> PMID: 26806592
73. Rivera P, Luque-Rojas MJ, Pastor A, Blanco E, Pavón FJ, Serrano A, et al. Diet-dependent modulation of hippocampal expression of endocannabinoid signaling-related proteins in cannabinoid antagonist-treated obese rats. *Eur J Neurosci*. 2012; 37(1):105–17. <https://doi.org/10.1111/ejn.12012> PMID: 23033907
74. Fezza F, Bari M, Florio R, Talamonti E, Feole M, Maccarrone M. Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Molecules*. 2014; 19(11):17078–106. <https://doi.org/10.3390/molecules191117078> PMID: 25347455
75. Jenniches I, Ternes S, Albayram O, Otte DM, Bach K, Bindila L, et al. Anxiety, Stress, and Fear Response in Mice with Reduced Endocannabinoid Levels. *Biol Psychiatry*. 2015; 79(10):858–68. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.03.033> PMID: 25981172
76. Guggenhuber S, Romo-Parra H, Bindila L, Leschik J, Lomazzo E, Remmers F, et al. Impaired 2-AG Signaling in Hippocampal Glutamatergic Neurons: Aggravation of Anxiety-Like Behavior and Unaltered Seizure Susceptibility. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015; 19(2):pii: pyv091.
77. Campos AC, Ferreira FR, Guimarães FS, Lemos JI. Facilitation of endocannabinoid effects in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behaviors depending on previous stress experience. *Neuroscience*. 2010; 167(2):238–46. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.01.062> PMID: 20167262

78. Avraham Y, Saidian M, Burston JJ, Mevorach R, Vorobiev L, Magen I, et al. Fish oil promotes survival and protects against cognitive decline in severely undernourished mice by normalizing satiety signals. *J Nutr Biochem.* 2011; 22(8):766–76. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.07.001> PMID: 21109417
79. Clarke DJ, Stuart J, McGregor IS, Arnold JC. Endocannabinoid dysregulation in cognitive and stress-related brain regions in the Nrg1 mouse model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2017; 72:9–15. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.08.006> PMID: 27521758
80. Almeida SS, Tonkiss J, Galler JR. Prenatal protein malnutrition affects exploratory behavior of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav.* 1996; 60(2):675–80. PMID: 8840934
81. Reyes-Castro LA, Rodriguez JS, Charco R, Bautista CJ, Larrea F, Nathanielsz PW, et al. Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. *Int J Dev Neurosci.* 2012; 30(1):39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.10.002> PMID: 22023958
82. Reyes-Castro LA, Rodriguez JS, Rodriguez-Gonzalez GL, Chavira R, Bautista CJ, McDonald TJ, et al. Pre- and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats. *Behav Brain Res.* 2012; 227(2):324–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.06.008> PMID: 21704656
83. de Souza MA, Szawka RE, Centenaro LA, Diehl LA, Lucion AB. Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference. *Physiol Behav.* 2012; 105(3):850–5. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.10.012> PMID: 22037198
84. Watanabe S, Doshi M, Hamazaki T. n-3 Polyunsaturated fatty acid (PUFA) deficiency elevates and n-3 PUFA enrichment reduces brain 2-arachidonoylglycerol level in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003; 69(1):51–9. PMID: 12878451
85. Dyall SC, Mandhair HK, Fincham RE, Kerr DM, Roche M, Molina-Holgado F. Distinctive effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in regulating neural stem cell fate are mediated via endocannabinoid signalling pathways. *Neuropharmacology.* 2016; 107:387–95. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.055> PMID: 27044662



## 2. EFECTO DE LA DIETA MATERNA HIPERCALÓRICA ALTAMENTE PALATABLE

En relación al modelo de dieta materna hipercalórica implementado en la presente investigación los efectos en el sistema endocannabinoide se evaluaron en la descendencia al nacimiento (**artículo 5**) y en la etapa adulta (**artículo 6**).



## 2.1 Efecto de la dieta materna hipercalórica: Impacto en los niveles de endocannabinoides de la descendencia al nacimiento

### 2.1.1 Artículo 5

*Exposure to a highly caloric palatable diet during pregestational and gestational periods affects hypothalamic and hippocampal endocannabinoid levels at birth and induces adiposity and anxiety-like behaviors in male rat offspring.*

En este artículo se **estudia el impacto de la dieta materna hipercalórica altamente palatable en los niveles cerebrales de endocannabinoides en las crías machos al nacimiento**. También, se muestran los efectos de la dieta materna hipercalórica y altamente palatable en las madres durante el periodo perinatal, específicamente en la ingesta calórica, ganancia de peso y adiposidad. Se analizan los resultados neonatales ahondando en el peso al nacimiento y en el tamaño de la camada. Se evalúan también los parámetros de crecimiento e ingesta calórica hasta la etapa adulta. Además, se estudia el impacto la dieta perinatal sobre ciertas respuestas conductuales (conductas relacionadas con la ansiedad, preferencia por chocolate y respuesta locomotora). Por primera vez, este artículo vincula la alteración en los niveles de endocannabinoides en dos estructuras claves para el metabolismo y control emocional, concretamente el hipotálamo e hipocampo, con el desarrollo posterior de alteraciones conductuales (conductas relacionadas con la ansiedad y menor preferencia por el chocolate) y metabólicas (alteración en los parámetros de crecimiento y adiposidad).



# Exposure to a Highly Caloric Palatable Diet During Pregestational and Gestational Periods Affects Hypothalamic and Hippocampal Endocannabinoid Levels at Birth and Induces Adiposity and Anxiety-Like Behaviors in Male Rat Offspring

María Teresa Ramírez-López<sup>1</sup>, Mariam Vázquez<sup>1,2</sup>, Laura Bindila<sup>3</sup>, Ermelinda Lomazzo<sup>3</sup>, Clementine Hofmann<sup>3</sup>, Rosario Noemí Blanco<sup>1</sup>, Francisco Alén<sup>1</sup>, María Antón<sup>1</sup>, Juan Decara<sup>2</sup>, Daniel Ouro<sup>1</sup>, Laura Orio<sup>1</sup>, Juan Suarez<sup>2</sup>, Beat Lutz<sup>3</sup>, Fernando Rodríguez de Fonseca<sup>1,2\*</sup> and Raquel Gómez de Heras<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

George W. Huntley,  
Icahn School of Medicine at  
Mount Sinai, USA

### Reviewed by:

Charles Mobbs,  
Icahn School of Medicine at  
Mount Sinai, USA  
Cesar Llogari Moreno,  
Icahn School of Medicine at  
Mount Sinai, USA

### \*Correspondence:

Fernando Rodríguez de Fonseca  
fernando.rodriguez@ibima.eu;  
Raquel Gómez de Heras  
rgomezhe@psi.ucm.es

Received: 24 June 2015

Accepted: 20 November 2015

Published: 06 January 2016

### Citation:

Ramírez-López MT, Vázquez M, Bindila L, Lomazzo E, Hofmann C, Blanco RN, Alén F, Antón M, Decara J, Ouro D, Orio L, Suarez J, Lutz B, Rodríguez de Fonseca F and Gómez de Heras R (2016) Exposure to a Highly Caloric Palatable Diet During Pregestational and Gestational Periods Affects Hypothalamic and Hippocampal Endocannabinoid Levels at Birth and Induces Adiposity and Anxiety-Like Behaviors in Male Rat Offspring.  
*Front. Behav. Neurosci.* 9:339.  
doi: 10.3389/fnbeh.2015.00339

<sup>1</sup>Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, <sup>2</sup>Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental, Instituto IBIMA, Hospital Regional Universitario de Málaga, Universidad de Málaga, Málaga, Spain, <sup>3</sup>Institute of Physiological Chemistry, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University of Mainz, Mainz, Germany

Exposure to unbalanced diets during pre-gestational and gestational periods may result in long-term alterations in metabolism and behavior. The contribution of the endocannabinoid system to these long-term adaptive responses is unknown. In the present study, we investigated the impact of female rat exposure to a hypercaloric-hypoproteic palatable diet during pre-gestational, gestational and lactational periods on the development of male offspring. In addition, the hypothalamic and hippocampal endocannabinoid contents at birth and the behavioral performance in adulthood were investigated. Exposure to a palatable diet resulted in low weight offspring who exhibited low hypothalamic contents of arachidonic acid and the two major endocannabinoids (anandamide and 2-arachidonoylglycerol) at birth. Palmitoylethanolamide, but not oleoylethanolamide, also decreased. Additionally, pups from palatable diet-fed dams displayed lower levels of anandamide and palmitoylethanolamide in the hippocampus. The low-weight male offspring, born from palatable diet exposed mothers, gained less weight during lactation and although they recovered weight during the post-weaning period, they developed abdominal adiposity in adulthood. These animals exhibited anxiety-like behavior in the elevated plus-maze and open field test and a low preference for a chocolate diet in a food preference test, indicating that maternal exposure to a hypercaloric diet induces long-term behavioral alterations in male offspring. These results suggest that maternal diet alterations in the function of the endogenous cannabinoid system can mediate the observed phenotype of the offspring, since both hypothalamic and hippocampal endocannabinoids regulate feeding, metabolic adaptations to caloric diets, learning, memory, and emotions.

**Keywords:** maternal diet, endocannabinoids, adipogenesis, anxiety, development, hypothalamus, hippocampus



## INTRODUCTION

Obesity and overweight prevalence are increasing worldwide in adults and children. Specifically, 11% of men and 15% of women were obese in 2014, whereas 6.7% of children were overweight in 2013 (World Health Organization, 2014). Additionally, obesity could be associated to the metabolic syndrome, which is defined as a combination of several risk factors that include hyperglycemia, increased blood pressure, elevated triglyceride levels, and low high-density lipoprotein cholesterol levels, besides central obesity (Alberti et al., 2009). This syndrome increases the risk of suffering from diabetes mellitus and cardiovascular diseases (Kaur, 2014). Furthermore, obesity has been linked to psychiatric disorders such as depression or anxiety, particularly when obese subjects have an unhealthy metabolic profile (Stunkard et al., 2003; Phillips and Perry, 2015).

Although lifestyle factors, such as highly palatable and nutrient-poor junk foods and reduced physical activity, play an important role in the etiology of obesity and metabolic syndrome, several epidemiological and experimental studies have pointed out that maternal malnutrition during critical periods of life could increase the vulnerability in offspring of suffering from metabolic diseases (Hales and Barker, 1992). This vulnerability can be extended to the incidence of behavioral disorders (Sullivan et al., 2014) later in life. The term which describes this process is known as nutritional programming (Lucas, 1991). In this regard and considering that maternal and postnatal nutrition tend to be excessive in Western societies, it has been shown that maternal obesity is commonly associated with macrosomy at birth (Baeten et al., 2001; Boney et al., 2005; Bhattacharya et al., 2007) and high risk of suffering from metabolic syndrome in adulthood (Danielzik et al., 2002; Boney et al., 2005; Catalano et al., 2009; Pirkola et al., 2010). Additionally, animal models have also shown that exposure to a hypercaloric diet or junk food (also known as cafeteria diet) during the perinatal period could alter various metabolic parameters later in life (Khan et al., 2005; Taylor et al., 2005; Srinivasan et al., 2006; Bayol et al., 2007; Samuelsson et al., 2008; Shankar et al., 2008; Howie et al., 2009; Kirk et al., 2009; White et al., 2009; Ong and Muhlhauser, 2011; Dahlhoff et al., 2014), even when mothers do not necessarily become obese (Guo and Jen, 1995; Langley-Evans, 1996; Comstock et al., 2012).

Furthermore, the exposure to hypercaloric diets and/or junk food have been associated to behavioral abnormalities, such as hyperphagia (Bayol et al., 2007; Samuelsson et al., 2008; Howie et al., 2009; Kirk et al., 2009; Ong and Muhlhauser, 2011), high preference for palatable food (Bayol et al., 2007; Ong and Muhlhauser, 2011) or food neophobia (Peleg-Raibstein et al., 2012). In addition, emotional behavior has been shown to be altered by a maternal hypercaloric diet or cafeteria diet (Sullivan et al., 2010; Wright et al., 2011; Peleg-Raibstein et al., 2012; Sasaki et al., 2013, 2014).

Several mechanisms associated with the process of malprogramming, which occurs during the perinatal period (Srinivasan et al., 2006), have been identified, such as oxidative stress after the exposure to hypercaloric or cafeteria diets (Bouanane et al., 2009), epigenetic modifications (Vucetic et al., 2011), and alterations in the hypothalamic-pituitary adrenal

(HPA) axis (Sasaki et al., 2013, 2014). Additionally, modifications in hypothalamic neuronal circuitries have been shown. Indeed, maternal high fat diet increases the number of neurons expressing orexigenic peptides and elevates the levels of mRNA of these neuropeptides in the offspring (Muhlhauser et al., 2006; Chang et al., 2008; Chen et al., 2009; Gupta et al., 2009; Stachowiak et al., 2013). Considering that the hypothalamus plays an important role in energy homeostasis, appetite, and body development, these findings may explain the long-term changes associated to eating habits and adiposity distribution. Furthermore, leptin, an important hormone secreted by white adipocytes, has been linked to the development of hypothalamus (Bouret et al., 2004; Cottrell et al., 2009). The dysregulation of this adipose tissue hormone has been documented in several studies, suggesting that leptin is critical for the establishment of developmental programming (Vickers and Sloboda, 2012). Additionally, alterations in opioid and dopaminergic signaling in the central reward pathway after the exposure to junk food have been described (Ong and Muhlhauser, 2011).

To date, the role of the endocannabinoid system in the process of nutritional programming has not yet been understood, even though it is tightly connected to other mechanisms that have been widely studied such as leptin (Di Marzo et al., 2001), opioid and dopaminergic systems (Cota et al., 2006, 2007). Endocannabinoids are signaling lipids produced from membrane long-chain fatty acids in response to neuronal activity (Mackie, 2008). The endocannabinoid system is particularly important in the regulation of energy metabolism, feeding behavior and energy homeostasis (Alen et al., 2013; Cristino et al., 2014). The dysregulation of this system has been associated to the development of obesity (Matias and Di Marzo, 2007; Bermudez-Silva et al., 2010) and neuropsychiatric diseases as well (Lutz, 2009).

The two main endocannabinoids, N-arachidonylethanolamide (anandamide, AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), are produced from arachidonic acid (AA) (Hansen and Artmann, 2008). Several studies have shown that altered nutritional conditions can modify endocannabinoid levels (Kirkham et al., 2002; Hanus et al., 2003; Alvheim et al., 2014), but unfortunately, only a few studies have investigated the effects of nutritional changes during the perinatal period. For instance, it has been shown that milk deficient of AA during lactation as well as maternal undernutrition decrease the levels of endocannabinoids in the brain during lactation or at weaning (Berger et al., 2001; Matias et al., 2003). Additionally, it has been found that the composition in fatty acids of the maternal diet produces changes in the endocannabinoids levels in the neonatal hypothalamus and hippocampus (D'Asti et al., 2010). Furthermore, it has been shown that lifelong n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) dietary insufficiency, from the perinatal period to adulthood, is associated to impairment in endocannabinoid-mediated neuronal functions in the adult brain (Lafourcade et al., 2011), and these modifications led to behavioral abnormalities (Lafourcade et al., 2011; Larrieu et al., 2012). In line with these findings, it has been recently proposed that maternal nutrition can alter endocannabinoid signaling and, thus, this system could act as a molecular substrate of

developmental programming (Keimpema et al., 2013). However, further investigations are necessary to clarify the role of the endocannabinoid system in this process.

In the present study, we investigated the effects of the exposure of female rats to a cafeteria diet (junk food) on neonatal outcomes and the levels of endocannabinoids and N-acyl ethanolamides in the hypothalamus of offspring at birth. Furthermore, offspring were monitored until adulthood, and the metabolic indices and behavioral parameters were examined. We propose that altered endocannabinoid levels at birth may reflect intrauterine changes due to the type of maternal diet, which may ultimately induce a metabolic imbalance in the offspring. Accordingly, we hypothesize that a maternal highly palatable diet may increase the risk in the offspring of suffering from metabolic diseases or psychiatric disorders later in life.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals, Diets, and Experimental Design

This study was approved by the Animal Ethics Committee of the Complutense University of Madrid and was conducted in compliance with the European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and in accordance with the current Spanish regulations (RD 53/2013 and 178/2004).

Experiments were performed initially in prepubertal female Wistar rats (Harlan, Barcelona, Spain). Animals were allowed to acclimate for 3 weeks before diet assignment. Rats were handled and individually housed at a 12 h light-dark cycle with temperature of  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . After the acclimatization period, animals were weighed (average weight:  $179 \pm 4$  g) and randomly assigned to control ( $n = 9$ ) or free-choice diet ( $n = 11$ ) animals. At this stage, there was not a statistically significant difference in body weight among groups.

Control rats were given free access to standard chow (standard chow SAFE A04, Panlab, Barcelona, Spain) and water. In contrast, free-choice rats were allowed to choose between standard rat chow (standard chow SAFE A04, Panlab, Barcelona, Spain) and a highly palatable food composed of a mixture of chocolates (cafeteria diet). Both types of food and water were provided *ad libitum* in both animal groups. The mixture of chocolate food was composed of a homogenous mixture of Mars<sup>®</sup>, Snickers<sup>®</sup>, Bounty<sup>®</sup>, and Milka<sup>®</sup> in equal proportions as previously described (Heyne et al., 2009; Martín-García et al., 2010). A detailed nutritional description of the composition of both types of food is shown in Table 1.

During the pregestational period, food intake and weight were measured weekly. The estrous cycle was evaluated daily starting from 2 weeks before mating to check cycle regularity. Eight weeks after the beginning of diet assignment, females were allowed to mate with males of the same strain in their home cage for 24 h at the beginning of the proestrous cycle. Each male rat was mated with females from both control and free-choice groups. The presence of a vaginal plug or spermatozoa in the vaginal smear the following morning confirmed successful mating, and this was designated as gestational day 0. During the gestational period,

TABLE 1 | Composition of the diets used in the present study.

	Standard chow diet	Highly palatable diet
Protein %	16.1%	6%
Carbohydrate %:	60%	60.4%
• Simple carbohydrates	3.3%	89%
Fat %:	3.1%	24.45%
• Saturated fatty acids	22.20%	56.2%
• Unsaturated fatty acids	77.70%	43.88%
Fiber %	4%	1.45%
Sodium %	0.0025%	0.17%
Energy	2.9 Kcal/g	4.88 Kcal/g

food intake and weight were measured daily and female rats were maintained on the same diet paradigm as in the pregestational period.

The day in which the litter was born was defined as postnatal day 0 (PN0). Within 14 h after birth, pups were weighed and sexed. The vitality of the pups was observed in every litter as well as the presence of prominent “milkbands” in pup stomachs, which is an indicative sign of adequate milk ingestion (Fride et al., 2003). The number of litters which presented pups without prominent milkbands was recorded for every experimental group. Litter size was arranged to comprise up to 8 pups, consisting of 4 males and 4 females. The remaining pups were quickly sacrificed by decapitation and brains were collected for further endocannabinoid measurement.

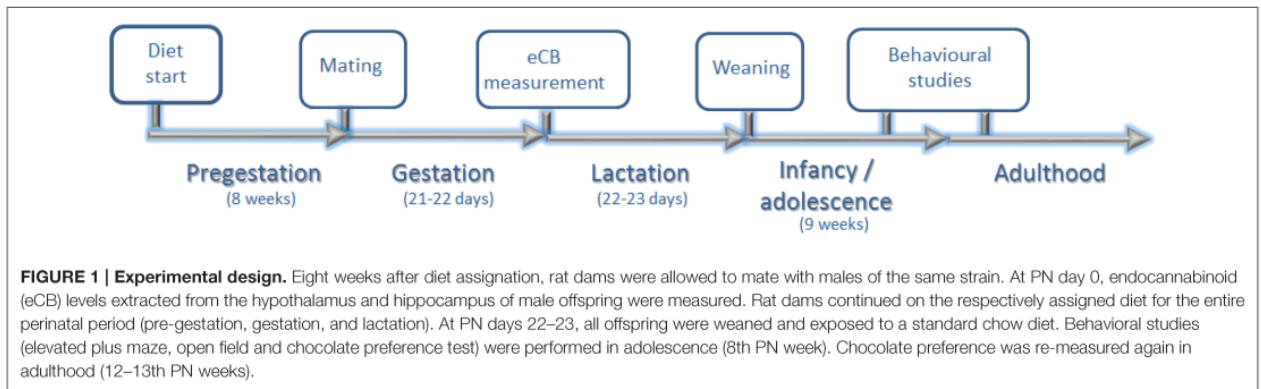
Rat dams were exposed to their respective diets throughout the lactation period. Food intake and dams/pups weight were measured 3 days per week during this period. At PN day 22–23, offspring from both animal groups were weaned and exposed to standard chow diet ( $n = 15$  and  $n = 17$  for control and free-choice perinatal diet groups, respectively). Rats belonging to the same litter from each perinatal diet group were housed together (2–3 rats/cage) where possible. Dams were sacrificed.

During the post-weaning period, weight and food intake were measured weekly. The total food intake from each cage was measured and equally divided according to the number of pups per cage to calculate individual food intake. Behavioral studies were performed in adolescence and adulthood (Figure 1). At the 5th postnatal month, three quarters of the male offspring were sacrificed.

All experiments were carried out exclusively for male offspring. The term “perinatal” was used here to refer to pregestational, gestational and lactation periods. We use the criteria described by Vickers to refer to different age stages (Vickers et al., 2000).

### Evaluation of Caloric Intake, Nutritional Intake, and Adiposity

Food intake was determined by subtracting the amount of each food type left in the cage from the total amount of food provided. Comparisons among groups were carried out by calculating cumulative caloric intake (Kcal/Kg) as well as weight gain in each period of the study.



Nutritional intake was evaluated by calculating food intake of both types of food (g) and the percentage of nutrients of the specific food provided, considering the data of **Table 1**. Comparisons among groups were performed by calculating cumulative intake (g) of proteins, carbohydrates and fats at the end of gestational and lactation periods (gestational day 20 and lactation day 21 respectively).

Adiposity was estimated by calculating the percentage of abdominal fat weight over total body weight at the time the animals were sacrificed. Rats were weighed immediately before death and sacrificed by decapitation after administration of Equitesin<sup>®</sup> (3 mg/kg). Then, perirenal and perigonadal fat deposits were dissected and weighed. The sum of both types of fat was used to determine the percentage of abdominal fat.

### Endocannabinoids Measurement

At PN day 0, the male offspring chosen to be sacrificed were decapitated during the second/third hour of the dark phase and brains were quickly removed and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until brain region isolation. To avoid litter effects, brains from at least three litters per group were used for endocannabinoid measurement (control pups  $n = 7-5$  and free-choice pups  $n = 13-11$ , for hypothalamus and hippocampus respectively). For the isolation of the brain regions selected, brains were thawed in cold Tris-HCl buffer (50 mM, pH = 7.40) and the entire hypothalamus and right hippocampus were immediately isolated and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until lipid extraction. The overall isolation procedure was carried out in less than 7 min for all animals to avoid *ex vivo* production/degradation of endocannabinoids.

For lipid extraction, pre-cooled steel balls of 5 mm were added to pre-cooled tubes containing the tissue. A solution of deuterated endocannabinoids (AEA-d4, 2-AG-d5, AA-d8, MAEA, OEA-d2, PEA-d4, and 1-AG-d5, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) in acetonitrile was added to the tissue along with 300  $\mu\text{l}$  of ice-cold 0.1 M formic acid and 300  $\mu\text{l}$  of ethylacetate/hexane (9:1, v/v). Then, the samples were homogenized with a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) for 60 s at 30 Hz. Subsequently, the samples were centrifuged for 10 min at 5000 g and  $4^{\circ}\text{C}$ . The organic phase was removed and evaporated under a gentle stream of nitrogen at  $37^{\circ}\text{C}$ . The aqueous phase was further used for protein

content determination. The lipid extract was re-dissolved in 50  $\mu\text{l}$  acetonitrile/water (1:1, v/v) and quantitative analysis of the endocannabinoid levels was carried out by liquid chromatography-multiple reaction monitoring (LC-MRM). The concentrations of internal standards, as well as the calibration curves, were set and tailored using test hypothalamus and hippocampal tissues. LC/MRM conditions for quantitative analysis of the endocannabinoids were set as previously reported (Wenzel et al., 2013) and endocannabinoid levels were normalized to the corresponding protein content of the tissues.

For protein quantification, the BCA method (bicinchoninic acid assay) was used and the measurements performed on a FLUOstar Galaxy (BMG Labtechnologies).

### Behavioral Studies

#### Elevated Plus Maze

In adolescence, at the 7–8th PN weeks, anxiety-related responses in handled animals were evaluated with the elevated plus maze. The elevated plus-maze (Panlab, Barcelona, Spain) consisted of a cross-shaped platform made of black and gray plastic. The platform was elevated 65 cm from the floor and had two opposing open arms (50  $\times$  10 cm) and two closed arms of the same size. The closed arms were fenced by 50-cm high opaque walls. A central area of 10  $\text{cm}^2$  connected all arms. The light intensity was set up at 150 lux in the open arms and 80 lux in the closed arms. The test was performed after 5 h after the beginning of the dark phase. When the test started, each rat was placed in the central area facing one of the open arms and opposite to the experimenter position. Then, the animal was allowed to explore the maze freely for 5 min. After, the rat was moved back to the home cage and the maze was cleaned. The number of open arm and closed arm entries and the percentage of time spent on open and closed arms were determined by a computer-controlled system recording the interruptions of infrared photo beams located along each arm. Data were analyzed by using the MAZESoft software (Panlab, Barcelona, Spain). Animals that fell off the maze during the test were excluded from the analysis.

#### Open Field

In the 2 days following the elevated plus maze test, locomotor activity and anxiety related responses were evaluated with the

open field test. The open field consisted of a square arena (80 cm × 80 cm and 40 cm high) virtually divided into a peripheral zone and a central zone (40 cm × 40 cm). It was made of plywood and was located in an experimental room illuminated with low light intensity (30 lux). The test was performed 5 h after the beginning of the dark phase. Each rat was positioned in the center of the open field and was allowed to explore freely for 5 min. After, the rat was moved back to the home cage and the arena was cleaned. A video camera installed above the arena was connected to a monitor and a video tracking motion analysis system (Smart, Panlab, Harvard Apparatus, Spain), which measured the total distance traveled (cm) and mean speed (cm/s). The program calculated the percentage of time spent on central area as well as the number of entries to the center zone as an index of anxiety-like behavior.

### Chocolate Preference Test

The chocolate preference test was performed in adolescence (8–9th PN weeks) and was repeated again in adulthood (12–13th PN weeks). At the beginning of the test, animals were single-housed in new cages provided with both types of food (standard chow and the mixture of chocolates) and water *ad libitum*. Food intake for both types of food and animal weight was determined 24 h after the beginning of the test. Chocolate preference was calculated as the percentage of chocolate eaten over total food provided.

### Statistical Analysis

All data are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis of results was performed by using the GraphPad Prism version 5.0 program (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and SPSS15.0 for windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Weight gain over the time and caloric intake were analyzed by One-way repeated measures analysis of variance (ANOVA). Multiple comparisons were assessed by Bonferroni *post-hoc* test. To assess the differences among groups the presence of prominent milkbands, the chi-squared test was performed. Differences in endocannabinoid levels were analyzed by using the U Mann Whitney test. The Kaplan Meier survival analysis and log-rank test were adopted to analyze diet-induced differences in the survival rate among the experimental groups. Results from the chocolate preference test were analyzed by Two-way ANOVA with group (control vs. free-choice animals) and age period used as variables. Further analyses were performed by using the Student *t*-test, when data passed normality requirements (D'Agostino-Pearson test), or U Mann Whitney test. A *p*-value below 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### Effect of Diet on Rat Dams during Perinatal Period

#### Weight Gain and Adiposity

Rat dams were exposed to their respective diets throughout the perinatal period (Figure 1). Repeated measures ANOVA revealed that dams from free-choice group gained more weight compared with controls before pregnancy [ $F_{(1,19)} = 14.844, p = 0.001$ ]

(Figure 2A), although no significant differences between control and free-choice groups in body weight at mating were found (data not shown). During the gestational period, the difference in weight gain between groups was not significant (Figure 2B). Interestingly, after birth and during lactation period, free-choice dams gained significantly less weight than controls [repeated measures ANOVA,  $F_{(1, 18)} = 41.836, p < 0.001$ ] (Figure 2C).

Regarding adiposity, palatable dams showed higher percentage of abdominal fat than controls at the end of the lactation period (weaning day) ( $t = 3.961, p < 0.001$ ) (Figure 2D), although no significant differences in body weight were detected during this period (data not shown).

#### Caloric Intake During Perinatal Period

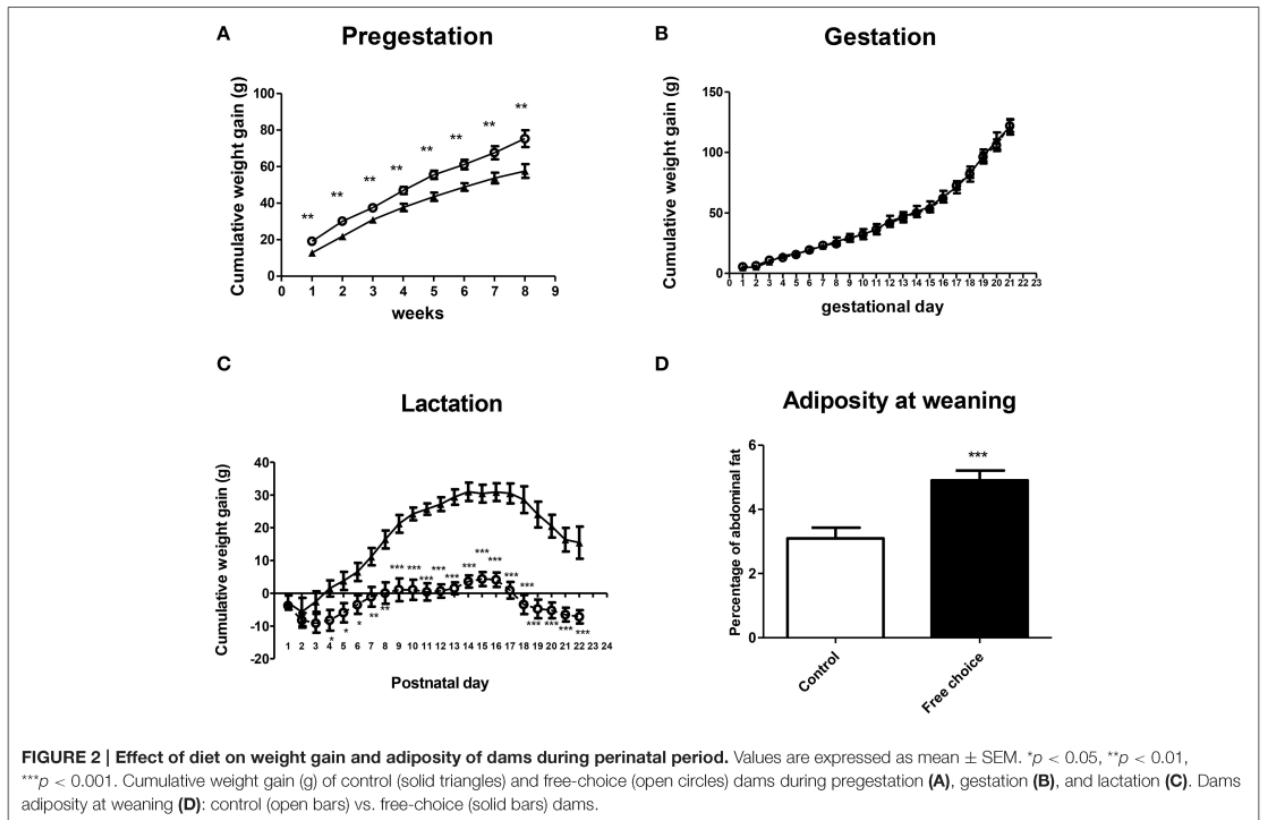
Repeated measures ANOVA showed that dams from the free-choice group had higher caloric intake than controls before pregnancy (pregestation) [ $F_{(1, 19)} = 28.607, p < 0.001$ ] (Figure 3A), which lasted for the entire gestational period [ $F_{(1, 17)} = 15.099, p = 0.001$ ] (Figure 3B). However, during the lactation period, no significant differences in caloric intake between groups were found (Figure 3C).

#### Nutritional Intake During Pregnancy and Lactation

During pregnancy and lactation, free-choice dams consumed significantly less proteins ( $t = 12.61, p < 0.0001$  and  $t = 10.93, p < 0.0001$  respectively) and less carbohydrates ( $t = 3.983, p < 0.001$  and  $t = 5.803, p < 0.0001$ , respectively) than controls (Supplementary Figure 1). In contrast, free-choice dams absorbed more fat than controls in gestation as well lactation period ( $t = 15.94, p < 0.0001$  and  $t = 15.65, p < 0.0001$ , respectively) (Supplementary Figure 1).

### Effect of Maternal Diet on Birth Outcomes and Mortality

Most of the pups from both groups were born between gestational days 21–22. Only in the free choice group, one litter was born at gestational day 20 and another litter at gestational day 23. Offspring from free-choice dams weighed significantly less than controls at birth either when analysis was done in both sexes together or in male and female separately (both sexes  $t = 9.552, p < 0.001$ , males  $t = 5.641, p < 0.001$  and females  $t = 8.142, p < 0.001$ ) (Supplementary Figure 2A). No significant differences in litter size for both sexes (control vs. free-choice) were found (Supplementary Figure 2B). The number of litters which presented some pups without prominent milkbands were significantly higher in free choice group, as revealed by the chi-squared test ( $\chi^2 df_1 = 5.454, p < 0.05$ ) (data not shown). Furthermore, a difference in the mortality rate between groups was found as 9.43% of male pups from the free-choice dams were dead at birth (4.31% of total newborn pups), whereas no casualties occurred in the control group (data not shown). Moreover, during the lactation period the Kaplan Meyer survival analysis and Log-rank test revealed higher mortality risk in offspring of both sexes from free-choice dams as compared to controls (Log-rank test:  $\chi^2 df_1 = 5.068, p < 0.05$ ) (Supplementary Figure 2C).



### Hypothalamic Endocannabinoid and N-Acylethanolamide Levels of Male Offspring at Birth

U Mann Whitney test analysis showed significant differences between the two groups in hypothalamic endocannabinoid levels at birth. Male pups from free-choice dams exhibited significantly lower levels of AEA ( $U = 9.000$ ,  $p < 0.01$ ), 2-AG ( $U = 10.00$ ,  $p < 0.001$ ), and AA ( $U = 13.00$ ,  $p < 0.05$ ) (Figures 4A–C, respectively). Palmitoylethanolamide (PEA) levels were also significantly decreased in offspring from free-choice rats ( $U = 16.00$ ,  $p < 0.05$ ) (Figure 4E). However, no significant differences between the two groups in oleoylethanolamide (OEA) levels were detected (Figure 4D). These results demonstrate that male offspring from free-choice diet dams had lower levels of the main endocannabinoids, their direct metabolite, AA, as well as PEA in the hypothalamus as compared to controls at birth.

### Hippocampal Endocannabinoid and N-Acylethanolamide Levels of Male Offspring at Birth

Regarding hippocampal endocannabinoids and N-acylethanolamides (NAEs), U Mann Whitney test revealed a significantly decreased content of AEA ( $U = 5.00$ ,  $p < 0.05$ ) and PEA ( $U = 9.00$ ,  $p < 0.05$ ) in offspring from free-choice

dams (Figures 4E,J, respectively). In contrast, there were no significant differences in the levels of 2-AG, AA and OEA between groups (Figures 4G–I respectively). These data indicate that male offspring from free choice dams had lower levels of anandamide and PEA.

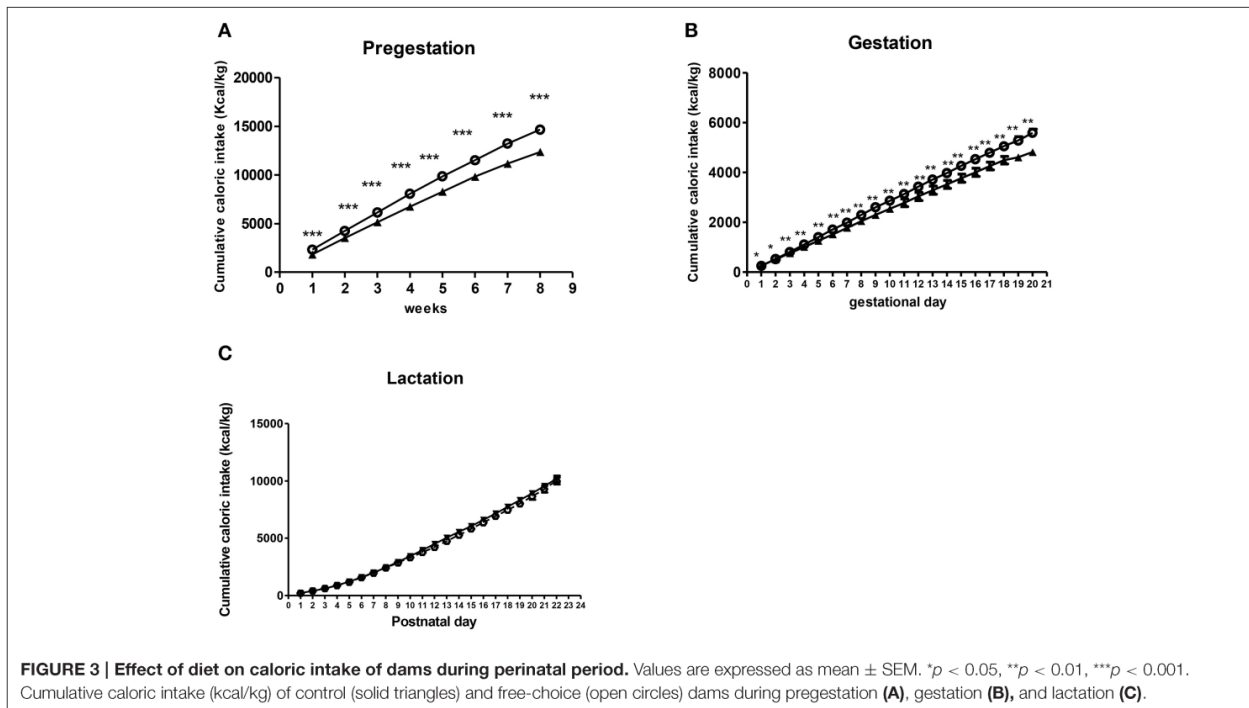
### Effect of Maternal Diet on Weight Gain, Caloric Intake and Body Composition in Male Offspring

#### Effect of Maternal Diet on Offspring Weight Gain in Lactation Period

Repeated measures ANOVA indicated that offspring from free-choice dams continued being leaner than control offspring during the lactation period [ $F_{(1, 71)} = 44.914$ ,  $p < 0.001$ ] (data not shown). They also gained less weight during this period as revealed by repeated measures ANOVA [ $F_{(1, 71)} = 34.599$ ,  $p < 0.001$ ] (Figure 5A).

#### Effect of Maternal Diet on Offspring Weight Gain and Caloric Intake in Post-Weaning Period

After weaning (post-weaning period), repeated measures ANOVA showed a significant effect of the perinatal diet on male offspring weight as well as weight gain during the entire post-weaning period [ $F_{(1, 28)} = 4.55$ ,  $p = 0.042$ , and  $F_{(1, 30)} = 4.277$ ,  $p = 0.047$ , respectively]. Particularly, Bonferroni's analysis



for comparisons among groups showed that offspring from free-choice dams gained significantly less weight than control offspring but only in the first 10 PN weeks, which is considered the pre-adult period [ $F_{(1, 30)} = 26.831$ ,  $p < 0.001$  in 4 PN week;  $F_{(1,30)} = 26.519$ ,  $p < 0.001$  in 5 PN week;  $F_{(1, 30)} = 29.526$ ,  $p < 0.001$  in 6 PN week;  $F_{(1, 30)} = 36.472$  in 7 PN week;  $F_{(1,30)} = 20.652$ ,  $p < 0.001$  in 8 PN week;  $F_{(1,30)} = 10.199$ ,  $p < 0.01$  in 9 PN week and  $F_{(1, 30)} = 4.723$ ,  $p < 0.05$  in 10 PN week] (Figure 5B).

Concerning the caloric intake, repeated measures ANOVA indicated that there was not a statistical difference between the two animal groups over the entire post-weaning period except in the 4th and 5th postnatal weeks, where offspring from free-choice dams showed higher caloric intake (kcal/kg) than controls [ $F_{(1, 30)} = 8.505$ ,  $p = 0.007$  and  $F_{(1, 30)} = 8.82$ ,  $p = 0.006$ , respectively] (Figure 5C).

Taken together, these results demonstrate that male offspring from free-choice dams showed decreased body weight followed by a likely compensatory increase in caloric intake, which occurred only in the first phase of the post-weaning period. Indeed, in the adolescence period no difference between the two animal groups was detected.

### Effect of Maternal Diet on Offspring Adiposity at Adulthood

At the 5th PN month, male offspring from free-choice dams showed significantly higher abdominal fat than control offspring ( $t = 3.008$ ,  $p < 0.01$ ) (Figure 5D), although no significant difference in weight between groups was found.

## Effect of Maternal Diet on Male Offspring Behavior

### Anxiety-related Responses: Elevated Plus Maze Test and Open Field Test

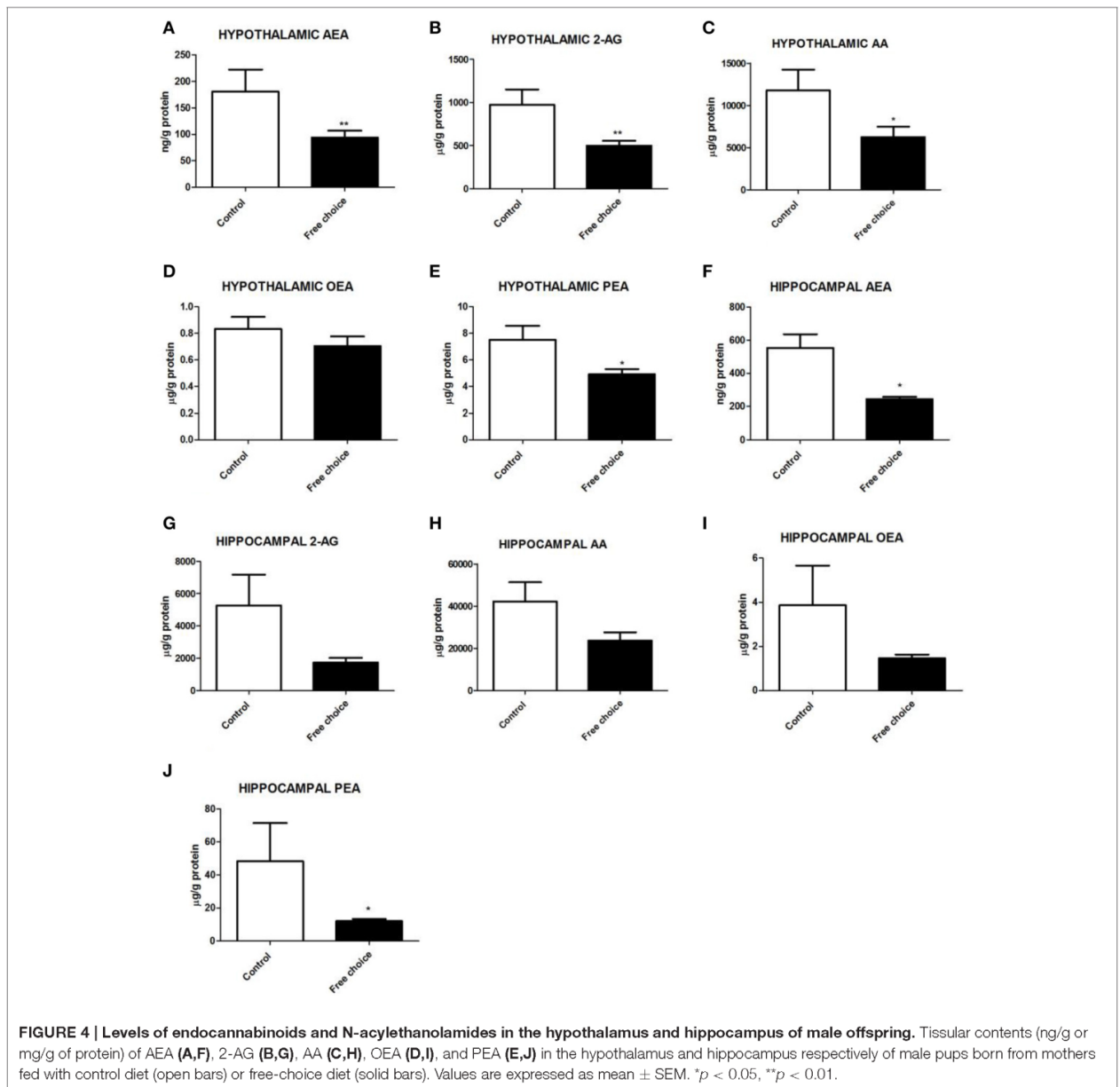
Student's  $t$ -test and U Mann Whitney test analysis revealed significant differences in the anxiety-like behavior between the two animal groups. Indeed, offspring from free-choice dams spent significantly less time in the open arms of the elevated plus maze ( $U = 45.50$ ,  $p < 0.05$ ) and entered less often in the open arms as compared to control rats ( $t = 2.129$ ,  $p < 0.05$ ) (Figures 6A,B, respectively). Conversely, offspring from free-choice dams spent longer time in the closed arms of elevated plus maze ( $t = 2.153$ ,  $p < 0.05$ ) and also entered more times in the closed arms as compared to control rats ( $t = 2.129$ ,  $p < 0.05$ ) (Figures 6C,D, respectively).

Regarding the open field test, U Mann Whitney and Student's  $t$ -test analysis showed that offspring from free choice dams spent significantly less time in the central area of the arena ( $U = 31.00$ ,  $p < 0.05$ ), although no significant differences between groups were found in the number of entries in the center zone ( $t = 1.400$ ,  $p = 0.17$ ) (Figures 6E,F respectively).

These results indicate that male offspring from dams exposed to palatable food (free-choice diet) displayed higher anxiety-related behavior than control (standard diet) offspring.

### Locomotor Activity: Open Field Test

Student's  $t$ -test analysis showed no significant differences between groups in the total distance traveled and mean speed in the open field test (Supplementary Figures 3A,B, respectively).

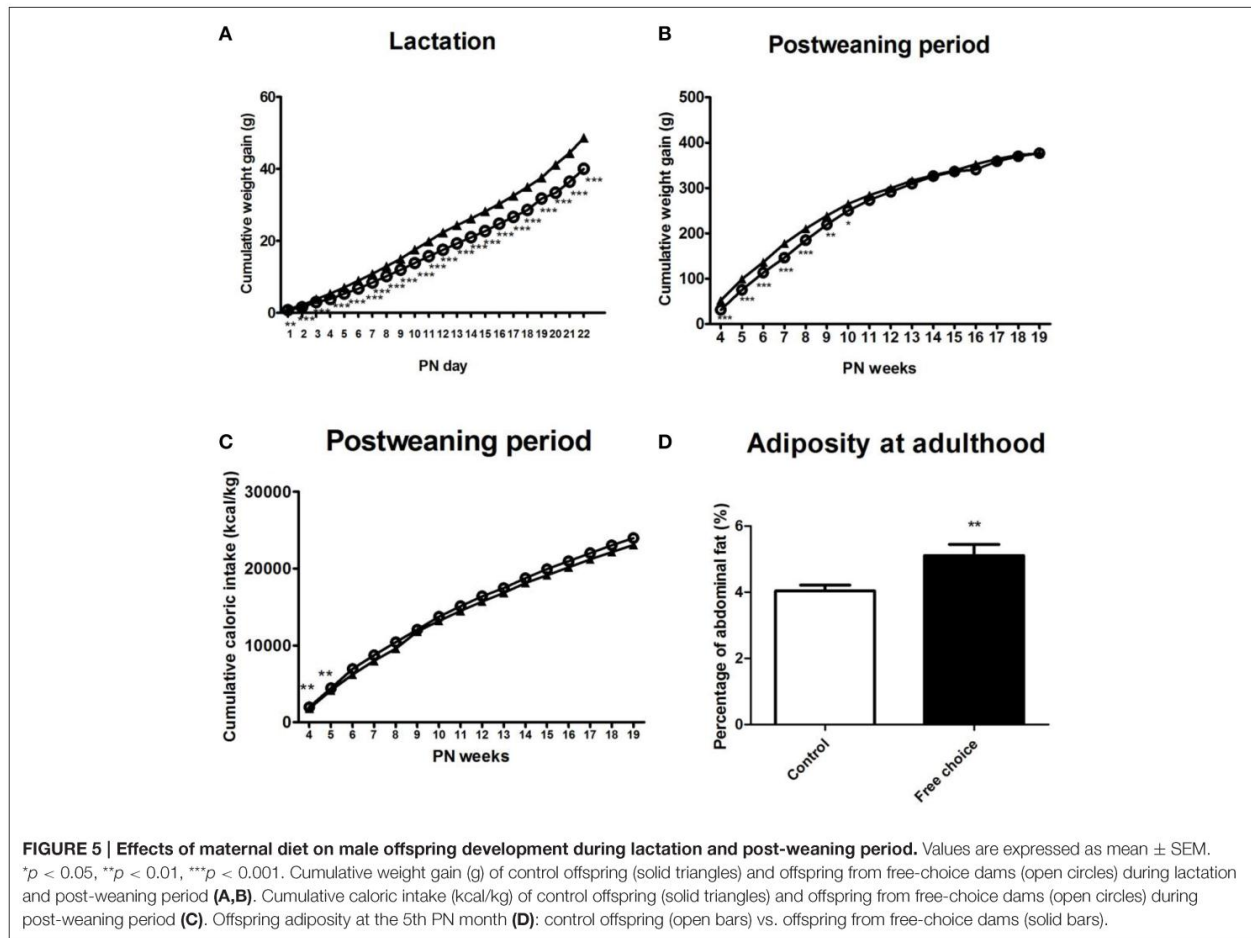


These results suggest that perinatal diet does not affect locomotor activity in the offspring.

### Chocolate Preference Test

Two-way ANOVA test performed on the chocolate preference test carried out in adolescence and adulthood, showed a statistically significant effect for both factors, animal group (type of perinatal diet) [ $F_{(1, 59)} = 14.848$ ,  $p < 0.001$ ] and age period (adolescence vs. adulthood) [ $F_{(1, 59)} = 39.557$ ,  $p < 0.001$ ]. However, no significant interaction between factors (diet type x age period) was found (Figure 7). Offspring from free-choice dams showed lower preference for chocolate food

in both age periods as compared to controls. In addition, the difference between the two animal groups was higher in adolescence [ $F_{(1, 29)} = 11.591$ ,  $p < 0.01$ ] than in adulthood [ $F_{(1, 31)} = 4.455$ ,  $p < 0.05$ ]. Moreover, the preference for chocolate increased with the age in both groups as offspring from both control [ $F_{(1, 27)} = 12.910$ ,  $p < 0.01$ ] and free-choice [ $F_{(1, 33)} = 29.510$ ,  $p < 0.001$ ] dams had higher chocolate preference in adulthood than in adolescence (Figure 7). In conclusion, these results indicate that offspring from dams exposed to palatable food (free-choice diet) displayed less chocolate preference than control offspring.



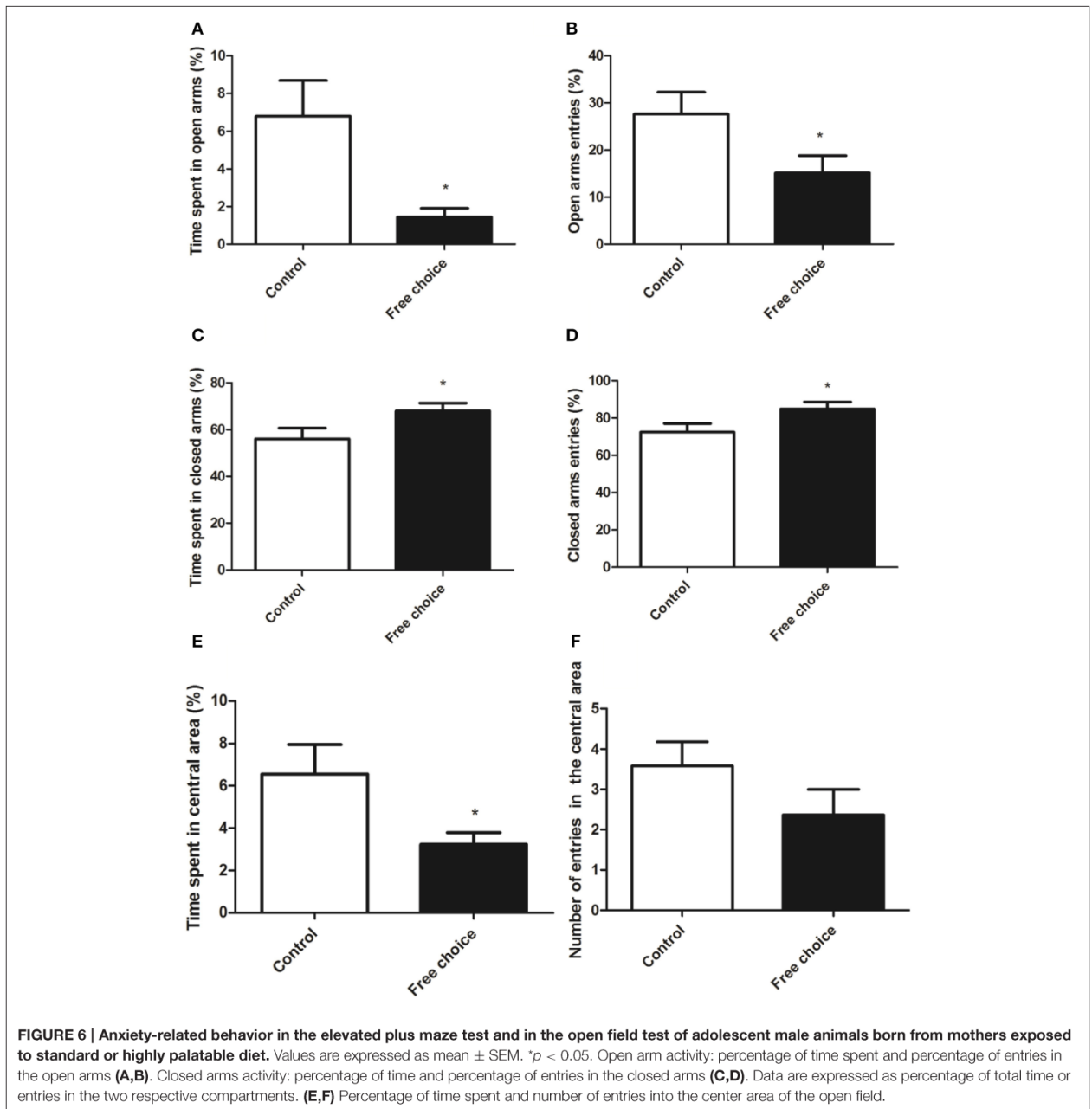
## DISCUSSION

The present study addressed the potential association of maternal consumption of a highly palatable food (free-choice), with (a) alterations in hypothalamic and hippocampal endocannabinoid levels in male offspring at birth, and (b) long-term phenotypic changes in adulthood. The results reported here clearly indicate that maternal over-nourishment with junk food is associated to long-term alterations in the offspring. The observed abnormalities in the pups included (a) low weight at birth, (b) altered contents of endocannabinoids and related acylethanolamides in both hypothalamus and hippocampus, and (c) long-term alterations in terms of abdominal adiposity and anxiety-like behaviors. As the endocannabinoid system has been implicated in the control of feeding, energy expenditure, adipose tissue physiology and the control of emotional behavior, we propose that the alterations in the hypothalamic/hippocampal endocannabinoid system can be linked to the phenotypic differences observed as a result of the type of maternal diet consumed.

## Maternal Highly Palatable Diet Alters Hypothalamic/Hippocampal Endocannabinoid Levels in Male Offspring at Birth

One of the main findings of the present study is the existence of alterations in the endocannabinoid contents in the brain of pups born from free-choice dams. As discussed below, these alterations might have potential implications in feeding (suckling behavior), adipogenesis, and might lead behavioral alterations such as anxiety. How maternal consumption of a cafeteria diet might affect brain endocannabinoids in the offspring? Arachidonic acid (20:4n-6), the precursor of the AEA and 2-AG, derives from dietary linoleic acid (18:2n-6), and it is reduced in the brain of the free-choice group offspring. It has been suggested that diets containing different polyunsaturated fatty acids, when given throughout adult life, could modify the levels of arachidonic acid and therefore, the content of endocannabinoids (Hansen and Artmann, 2008). The decrease in arachidonic acid in the offspring may have been determined by the decreased availability of linoleic acid in the maternal diet, and the reduced protein



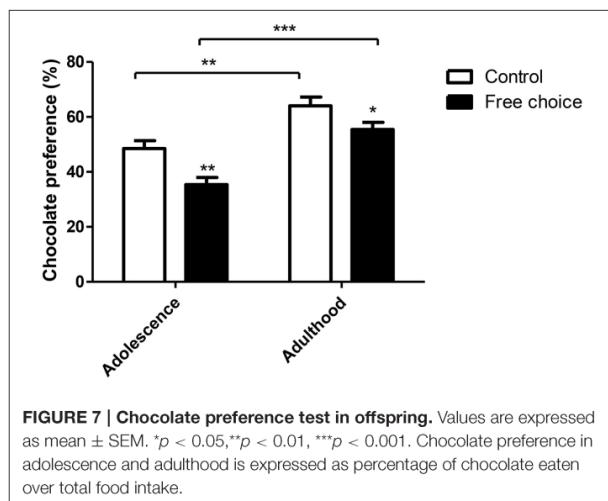


intake in the dams. Although we have not examined the specific composition of polyunsaturated fatty acids in the cafeteria diet (highly palatable diet), this diet contains a high percentage of fat, especially saturated fat (56.2% vs. 22.2%, **Table 1**). Several studies have shown changes in arachidonic acid levels or its derivatives depending on the saturated fatty acids composition of the diet. Indeed, a diet rich in saturated fat leads to decreased 2-AG and OEA levels when compared to a diet rich in oleic acid or arachidonic acid (Artmann et al., 2008). The presence of n-3 fatty acids could also impair arachidonic acid levels depending on

the saturated fatty acid and linoleic acid content in the diet (Garg et al., 1990).

### Potential Impact of Reduced Endocannabinoids in Feeding Behavior during Lactation

Newborn pups from free-choice dams exhibited marked reductions of endocannabinoid levels in the hypothalamus and the hippocampus. It has been shown that the endocannabinoid



system has a pivotal role in milk suckling, which might lead to alterations in growth during lactation, and consequently to low weight gain, as reported here (Figure 5). Decreased milk ingestion during the first days of life has been reported in cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor knockout mice (CB<sub>1</sub>-KO) and after pharmacological blockade of CB<sub>1</sub> receptor in newborn pups (Fride et al., 2001, 2003). Thus, the activation of the CB<sub>1</sub> receptor appears to be critical for the initiation of milk suckling. In line with this evidence, we noticed that litters from cafeteria diet-fed mothers showed less pronounced milkbands at birth (data not shown) and displayed lower levels of hypothalamic AEA, 2-AG and PEA than controls at PN day 0, which might have affected the suckling process. Therefore, we hypothesize that deficient suckling together with diminished milk supply and protein content could have altered weight gain in the pups during lactation. This hypothesis is supported by previous reports adopting a study design similar to ours (Bayol et al., 2007; Ong and Muhlhauser, 2011) showing that male pups from cafeteria diet-fed dams remained leaner even during lactation. Therefore, we can attribute the low weight gain to both an endocannabinoid-related decreased suckling and a delayed lactogenesis, as suggested for obese or overweight mothers (Rasmussen et al., 2001; Rasmussen and Kjolhede, 2004; Matias et al., 2014). Indeed, our study shows that dams exhibited higher abdominal adiposity at weaning. The combination of both factors could have led to a diminished milk intake by the pups and to a low protein intake, which consequently may have affected their early and late development.

Whether or not the hypothalamic endocannabinoid changes are a main factor in the low weight observed in free-choice offspring remains to be determined. Our data are in line with several previous works using pregnant rats exposed to junk food (cafeteria diet) (Bayol et al., 2007; Ong and Muhlhauser, 2011) or high fat diet (Guo and Jen, 1995; Langley-Evans, 1996; Howie et al., 2009). Both macrosomy and low weight at birth have been described in humans and rodents exposed to overnutrition (Baeten et al., 2001; Holemans et al., 2004; Boney et al., 2005; Bhattacharya et al., 2007; Samuelsson et al., 2008; Rajasingam et al., 2009). Moreover, these effects have been shown to depend

on the fatty acid and saturated fat composition of the diet, and the duration of high-fat diet exposure (Hausman et al., 1991; Sullivan et al., 2011). Another important criterion to consider is the combination of high fat level consumption and low protein intake during pregnancy, as reported in several works (Bayol et al., 2007; Ong and Muhlhauser, 2011). Indeed, considering that the proteins present in the diet provide a supply of amino acids and essential nutrients, which are required for an adequate growth, animals exposed to a protein-restricted diet generate offspring with low body weight at birth (Bonatto et al., 2005; Feoli et al., 2006; Coupé et al., 2010). In our study, a low milk intake in the free-choice pups could have generated a state of protein malnutrition equivalent to that reported in these previous studies.

### Maternal Highly Palatable Diet Alters Adiposity in Adult Offspring

The endocannabinoid system is involved in adipogenesis and fat accumulation (Matias and Di Marzo, 2007), however, to date, it has not been studied as a potential modulator of metabolic and behavioral programming. The reduced hypothalamic endocannabinoid levels found at birth may have had possible implications for the development of adiposity later in adulthood. However, considering that free-choice group offspring were fed with a standard diet after weaning, the decreased endocannabinoid levels at birth cannot be directly correlated to the development of adipogenesis in adulthood. Measurement of endocannabinoid levels in the offspring at different age periods in the future will provide important information to corroborate this notion. In any case, several works using dietary manipulations during perinatal exacerbates adiposity later in life (Bayol et al., 2008; Samuelsson et al., 2008; Shankar et al., 2008; Howie et al., 2009; Dahlhoff et al., 2014). Therefore, in our case, exposing animals to a standard chow diet at weaning may have raised the possibility to develop adiposity later in life. It is also interesting to note that offspring from cafeteria diet-fed dams weigh less in the neonatal period but reached the same weight as control dams at adolescence, as mentioned before. In line with this observation, an association between low birth weight and long term adiposity has been reported in both animal models and humans (Ravelli et al., 1976, 1999; Anguita et al., 1993; Valdez et al., 1994). Some factors implicated may be compensation after early malnutrition (Bieswal et al., 2006; Bol et al., 2009) and upregulation of the adipogenic signaling pathway, such as genes involved in adipocyte differentiation (Guan et al., 2005) and lipogenic transcription factors (Desai et al., 2008). These modifications can lead to adipocyte hypertrophy and increased lipid storage later in life. Whether this is an endocannabinoid-related response remains to be determined.

### Maternal Highly Palatable Diet Increases Anxiety-Related Response in Offspring: An Endocannabinoid-Related Developmental Effect?

Consistent with previous works (Sasaki et al., 2013), we found that motor activity was not impaired in offspring from highly

palatable diet-fed mothers. However, maternal exposure to this diet results in clear anxiety-like behaviors in the offspring. Similar results have been reported in the offspring after maternal exposure to high-fat diet (Sullivan et al., 2010; Peleg-Raibstein et al., 2012; Sasaki et al., 2013), although several discrepancies have been reported in literature on this matter (Wright et al., 2011; Sasaki et al., 2014) probably due to methodological issues such as the intensity of the illumination used in the elevated plus maze test, or the composition of the diet given during the perinatal period. In this study we used a low protein cafeteria diet and maternal low protein diets have been associated to increased anxiety in offspring (Reyes-Castro et al., 2012).

The anxious phenotype observed in male offspring born from mothers exposed to the free-choice diet can be related to the alterations in brain endocannabinoids observed. Endocannabinoids are important modulators in the development of the fetal brain (Berrendero et al., 1999). Moreover, several studies have described important changes in endocannabinoid levels in the developmental brain as a result of dietary manipulations (Berger et al., 2001; Matias et al., 2003; D'Asti et al., 2010). As the endocannabinoid system plays a relevant role in processes such as cell fate, neuronal proliferation, migration, phenotype acquisition and synaptogenesis (Rodríguez de Fonseca et al., 1991; Berrendero et al., 1999; Keimpema et al., 2013), changes in brain endocannabinoid levels during development are likely capable to influence the final brain organization. Considering that, it has been suggested that alterations in endocannabinoid signaling by exposure to harmful stimuli such as THC during critical windows, could lead to alterations in neuronal wiring and consequently, to the risk of suffering behavioral or metabolic alterations later in life, depending on the localization and function of the circuit altered (Keimpema et al., 2013). The present study shows for first time that perinatal exposure to highly palatable diet leads to impairment in the main endocannabinoids and NAEs at birth in brain regions involved in the control of emotional behavior, such as hypothalamus and hippocampus (Navarro et al., 1997; Lutz, 2009). This is consistent with previous reports showing that dysregulation in the endocannabinoid system, due to long-term inadequate nutrition in early life stages, could lead to increased anxiety later in life (Lafourcade et al., 2011; Larrieu et al., 2012).

### Maternal Highly Palatable Diet Alters Food Preference in Offspring

Finally, we addressed the question of whether the alterations found in the endocannabinoid system as a result of maternal diet might have an impact in food preferences in the offspring. It has been proposed that food preferences can be programmed during early life. The endogenous cannabinoid system has been implicated in food preference (Dore et al., 2014) and sweet taste perception (Niki et al., 2015) and dysregulation of this system during development may have an impact in food preferences. Indeed, it has been reported that maternal consumption of junk food increases the preference of the offspring for this type of food later in life (Bayol et al., 2007; Ong and Muhlhausler, 2011). In contrast, in our study, offspring from cafeteria diet-fed dams displayed lower chocolate preference compared to

controls, although they were exposed to this type of meal through their mothers early in life. This discrepancy can be explained on the basis of a potential neophobic response, considering that in the chocolate preference test a novel palatable food was provided in a new environment. This neophobic response is in agreement with the anxious phenotype of these animals, and it has been previously reported, for instance, in offspring from dams exposed to high-fat diet (Peleg-Raibstein et al., 2012).

## CONCLUSIONS

We have demonstrated that maternal exposure to a highly palatable diet results in changes in newborn male offspring, such as low body weight and decreased levels of endocannabinoids and NAEs in hypothalamus and hippocampus. These changes are associated with long-lasting consequences, as increased adiposity, anxiety-like behavior and reduced food preferences in adulthood. This is the first study to propose diet-induced alterations in the endocannabinoid levels at birth as a potential mechanism associated to long-term phenotypic consequences. Because of the current epidemics of obesity in western societies, the present work might help to design human studies to investigate to which extent these findings can be translated to humans, considering that dietary supplement of essential fatty acids is currently used as a simple preventive intervention. Understanding why dietary manipulations modify hypothalamic and hippocampal endocannabinoid levels and whether these changes lead to permanent dysfunctions in the body still need to be further investigated to clarify the role of the endocannabinoid system in nutritional programming.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad (PI13/0226 to FR, CP12/03109 to JS and PSI-2012-35388 to RG), Red de Trastornos Adictivos (RD12/0028/0001 to FR), CIBERobn, Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía, UE/ERDF (PI45403, CTS-8221, CTS-433 to FR), Consejería de Salud, Junta de Andalucía (PI0232/2008, PI0029/2008, and SAS111224 to JS and FR), and the German Research Foundation DFG (FOR926, project CP1 to BL). MT RL has been funded by a FPU predoctoral fellowship of the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (AP-2009-0225); JS holds “Miguel Servet” research contract from the National System of Health, ISCIII (grant numbers CP14/00173). The authors also thank Claudia Schwitter for her help and support during lipid extraction and BCA analysis.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2015.00339>

## REFERENCES

- Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., et al. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120, 1640–1645. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644
- Alen, F., Ramírez-López, M. T., Gómez de Heras, R., Rodríguez de Fonseca, F., and Orio, L. (2013). Cannabinoid receptors and cholecystokinin in feeding inhibition. *Vitam. Horm.* 92, 165–196. doi: 10.1016/B978-0-12-410473-0.00007-6
- Alvheim, A. R., Torstensen, B. E., Lin, Y. H., Lillefosse, H. H., Lock, E. J., Madsen, L., et al. (2014). Dietary linoleic acid elevates the endocannabinoids 2-AG and anandamide and promotes weight gain in mice fed a low fat diet. *Lipids* 49, 59–69. doi: 10.1007/s11745-013-3842-y
- Anguita, R. M., Sigulem, D. M., and Sawaya, A. L. (1993). Intrauterine food restriction is associated with obesity in young rats. *J. Nutr.* 123, 1421–1428.
- Artmann, A., Petersen, G., Hellgren, L. I., Boberg, J., Skonberg, C., Nellemann, C., et al. (2008). Influence of dietary fatty acids on endocannabinoid and N-acyl ethanolamine levels in rat brain, liver and small intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 1781, 200–212. doi: 10.1016/j.bbali.2008.01.006
- Baeten, J. M., Bukusi, E. A., and Lambe, M. (2001). Pregnancy complications and outcomes among overweight and obese nulliparous women. *Am. J. Public Health* 91, 436–440. doi: 10.2105/AJPH.91.3.436
- Bayol, S. A., Farrington, S. J., and Stickland, N. C. (2007). A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Br. J. Nutr.* 98, 843–851. doi: 10.1017/S0007114507812037
- Bayol, S. A., Simbi, B. H., Bertrand, J. A., and Stickland, N. C. (2008). Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females. *J. Physiol.* 586, 3219–3230. doi: 10.1113/jphysiol.2008.153817
- Berger, A., Crozier, G., Bisogno, T., Cavaliere, P., Innis, S., and Di Marzo, V. (2001). Anandamide and diet: inclusion of dietary arachidonate and docosahexaenoate leads to increased brain levels of the corresponding N-acyl ethanolamines in piglets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6402. doi: 10.1073/pnas.101119098
- Bermudez-Silva, F. J., Viveros, M. P., McPartland, J. M., and Rodríguez de Fonseca, F. (2010). The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95, 375–382. doi: 10.1016/j.pbb.2010.03.012
- Berrendero, F., Sepe, N., Ramos, J. A., Di Marzo, V., and Fernández-Ruiz, J. J. (1999). Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse* 33, 181–191.
- Bhattacharya, S., Campbell, D. M., Liston, W. A., and Bhattacharya, S. (2007). Effect of Body Mass Index on pregnancy outcomes in nulliparous women delivering singleton babies. *BMC Public Health* 7:168. doi: 10.1186/1471-2458-7-168
- Bieswal, F., Ahn, M. T., Reusens, B., Holvoet, P., Raes, M., Rees, W. D., et al. (2006). The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity (Silver Spring)* 14, 1330–1343. doi: 10.1038/oby.2006.151
- Bol, V. V., Delattre, A. I., Reusens, B., Raes, M., and Remacle, C. (2009). Forced catch-up growth after fetal protein restriction alters the adipose tissue gene expression program leading to obesity in adult mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R291–R299. doi: 10.1152/ajpregu.90497.2008
- Bonatto, F., Polydoro, M., Andrades, M. E., da Frota Júnior, M. L., Dal-Pizzol, F., Rotta, L. N., et al. (2005). Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. *Brain Res.* 1042, 17–22. doi: 10.1016/j.brainres.2005.02.002
- Boney, C. M., Verma, A., Tucker, R., and Vohr, B. R. (2005). Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 115, e290–e296. doi: 10.1542/peds.2004-1808
- Bouanane, S., Benkalfat, N. B., Baba Ahmed, F. Z., Merzouk, H., Mokhtari, N. S., Merzouk, S. A., et al. (2009). Time course of changes in serum oxidant/antioxidant status in overfed obese rats and their offspring. *Clin. Sci. (Lond.)* 116, 669–680. doi: 10.1042/CS20080413
- Bouret, S. G., Draper, S. J., and Simerly, R. B. (2004). Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J. Neurosci.* 24, 2797–2805. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5369-03.2004
- Catalano, P. M., Farrell, K., Thomas, A., Huston-Presley, L., Mencin, P., de Mouzon, S. H., et al. (2009). Perinatal risk factors for childhood obesity and metabolic dysregulation. *Am. J. Clin. Nutr.* 90, 1303–1313. doi: 10.3945/ajcn.2008.27416
- Chang, G. Q., Gaysinskaya, V., Karatayev, O., and Leibowitz, S. F. (2008). Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J. Neurosci.* 28, 12107–12119. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2642-08.2008
- Chen, H., Simar, D., and Morris, M. J. (2009). Hypothalamic neuroendocrine circuitry is programmed by maternal obesity: interaction with postnatal nutritional environment. *PLoS ONE* 4:e6259. doi: 10.1371/journal.pone.0006259
- Comstock, S. M., Pound, L. D., Bishop, J. M., Takahashi, D. L., Kostrba, A. M., Smith, M. S., et al. (2012). High-fat diet consumption during pregnancy and the early post-natal period leads to decreased alpha cell plasticity in the nonhuman primate. *Mol. Metab.* 2, 10–22. doi: 10.1016/j.molmet.2012.11.001
- Cota, D., Steiner, M. A., Marsicano, G., Cervino, C., Herman, J. P., Grübler, Y., Stalla, J., et al. (2007). Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Endocrinology* 148, 1574–1581. doi: 10.1210/en.2005-1649
- Cota, D., Tschöp, M. H., Horvath, T. L., and Levine, A. S. (2006). Cannabinoids, opioids and eating behavior: the molecular face of hedonism? *Brain Res. Rev.* 51, 85–107. doi: 10.1016/j.brainresrev.2005.10.004
- Cottrell, E. C., Cripps, R. L., Duncan, J. S., Barrett, P., Mercer, J. G., Herwig, A., et al. (2009). Developmental changes in hypothalamic leptin receptor: relationship with the postnatal leptin surge and energy balance neuropeptides in the postnatal rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R631–R639. doi: 10.1152/ajpregu.90690.2008
- Coupé, B., Amarger, V., Grit, I., Benani, A., and Parnet, P. (2010). Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology* 151, 702–713. doi: 10.1210/en.2009-0893
- Cristino, L., Becker, T., and Di Marzo, V. (2014). Endocannabinoids and energy homeostasis: an update. *Biofactors* 40, 389–397. doi: 10.1002/biof.1168
- Dahlhoff, M., Pfister, S., Blutke, A., Rozman, J., Klingenspor, M., Deutsch, M. J., et al. (2014). Peri-conceptual obesogenic exposure induces sex-specific programming of disease susceptibilities in adult mouse offspring. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 304–317. doi: 10.1016/j.bbdis.2013.11.021
- Danielzik, S., Langnäse, K., Mast, M., Spethmann, C., and Müller, M. J. (2002). Impact of parental BMI on the manifestation of overweight 5–7 year old children. *Eur. J. Nutr.* 41, 132–138. doi: 10.1007/s00394-002-0367-1
- D'Asti, E., Long, H., Tremblay-Mercier, J., Grajzer, M., Cunnane, S. C., Di Marzo, V., et al. (2010). Maternal dietary fat determines metabolic profile and the magnitude of endocannabinoid inhibition of the stress response in neonatal rat offspring. *Endocrinology* 151, 1685–1694. doi: 10.1210/en.2009-1092
- Desai, M., Guang, H., Ferelli, M., Kalichanda, N., and Lane, R. H. (2008). Programmed upregulation of adipogenic transcription factors in intrauterine growth-restricted offspring. *Reprod. Sci.* 15, 785–796. doi: 10.1177/1933719108318597
- Di Marzo, V., Goparaju, S. K., Wang, L., Liu, J., Batkai, S., Jári, Z., et al. (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410, 822–825. doi: 10.1038/35071088
- Dore, R., Valenza, M., Wang, X., Rice, K. C., Sabino, V., and Cottone, P. (2014). The inverse agonist of CB1 receptor SR141716 blocks compulsive eating of palatable food. *Addict Biol.* 19, 849–861. doi: 10.1111/adb.12056
- Feoli, A. M., Siqueira, I. R., Almeida, L., Tramontina, A. C., Vanzella, C., Sbaraini, S., et al. (2006). Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition* 22, 160–165. doi: 10.1016/j.nut.2005.06.007
- Fride, E., Foox, A., Rosenberg, E., Faigenboim, M., Cohen, V., Barda, L., et al. (2003). Milk intake and survival in newborn cannabinoid CB1 receptor knockout mice: evidence for a "CB3" receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 461, 27–34. doi: 10.1016/S0014-2999(03)01295-0
- Fride, E., Ginzburg, Y., Breuer, A., Bisogno, T., Di Marzo, V., and Mechoulam, R. (2001). Critical role of the endogenous cannabinoid system in mouse pup

- suckling and growth. *Eur. J. Pharmacol.* 419, 207–214. doi: 10.1016/S0014-2999(01)00953-0
- Garg, M. L., Thomson, A. B., and Clandinin, M. T. (1990). Interactions of saturated, n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids to modulate arachidonic acid metabolism. *J. Lipid Res.* 31, 271–277.
- Guan, H., Arany, E., van Beek, J. P., Chamson-Reig, A., Thyssen, S., Hill, D. J., et al. (2005). Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E663–E673. doi: 10.1152/ajpendo.00461.2004
- Guo, F., and Jen, K. L. (1995). High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol. Behav.* 57, 681–686. doi: 10.1016/0031-9384(94)00342-4
- Gupta, A., Srinivasan, M., Thamadolik, S., and Patel, M. S. (2009). Hypothalamic alterations in fetuses of high fat diet-fed obese female rats. *J. Endocrinol.* 200, 293–300. doi: 10.1677/JOE-08-0429
- Hales, C. N., and Barker, D. J. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35, 595–601. doi: 10.1007/BF00400248
- Hansen, H. S., and Artmann, A. (2008). Endocannabinoids and nutrition. *J. Neuroendocrinol.* 20(Suppl. 1), 94–99. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01687.x
- Hanus, L., Avraham, Y., Ben-Shushan, D., Zolotarev, O., Berry, E. M., and Mechoulam, R. (2003). Short-term fasting and prolonged semistarvation have opposite effects on 2-AG levels in mouse brain. *Brain Res.* 983, 144–151. doi: 10.1016/S0006-8993(03)03046-4
- Hausman, D. B., McCloskey, H. M., and Martin, R. J. (1991). Maternal dietary fat type influences the growth and fatty acid composition of newborn and weanling rats. *J. Nutr.* 121, 1917–1923.
- Heyne, A., Kiesselbach, C., Sahún, I., McDonald, J., Gaiffi, M., Dierssen, M., et al. (2009). An animal model of compulsive food-taking behaviour. *Addict. Biol.* 14, 373–383. doi: 10.1111/j.1369-1600.2009.00175.x
- Holemans, K., Caluwaerts, S., Poston, L., and Van Assche, F. A. (2004). Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190, 858–865. doi: 10.1016/j.ajog.2003.09.025
- Howie, G. J., Sloboda, D. M., Kamal, T., and Vickers, M. H. (2009). Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J. Physiol.* 587, 905–915. doi: 10.1113/jphysiol.2008.163477
- Kaur, J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* 2014:943162. doi: 10.1155/2014/943162
- Keimpea, E., Calvigioni, D., and Harkany, T. (2013). Endocannabinoid signals in the developmental programming of delayed-onset neuropsychiatric and metabolic illnesses. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1569–1576. doi: 10.1042/BST20130117
- Khan, I. Y., Dekou, V., Douglas, G., Jensen, R., Hanson, M. A., Poston, L., et al. (2005). A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, R127–R133. doi: 10.1152/ajpregu.00354.2004
- Kirk, S. L., Samuelsson, A. M., Argenton, M., Dhonye, H., Kalamatianos, T., Poston, L., et al. (2009). Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS ONE* 4:e5870. doi: 10.1371/journal.pone.0005870
- Kirkham, T. C., Williams, C. M., Fezza, F., and Di Marzo, V. (2002). Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br. J. Pharmacol.* 136, 550–557. doi: 10.1038/sj.bjp.0704767
- Lafourcade, M., Larrieu, T., Mato, S., Duffaud, A., Sepers, M., Matias, I., et al. (2011). Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat. Neurosci.* 14, 345–350. doi: 10.1038/nn.2736
- Langley-Evans, S. C. (1996). Intrauterine programming of hypertension in the rat: nutrient interactions. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 114, 327–333. doi: 10.1016/0300-9629(96)00018-7
- Larrieu, T., Madore, C., Joffre, C., and Layé, S. (2012). Nutritional n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency alters cannabinoid receptor signaling pathway in the brain and associated anxiety-like behavior in mice. *J. Physiol. Biochem.* 68, 671–681. doi: 10.1007/s13105-012-0179-6
- Lucas, A. (1991). Programming by early nutrition in man. *Ciba Found. Symp.* 156, 38–50; discussion: 50–55.
- Lutz, B. (2009). Endocannabinoid signals in the control of emotion. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 46–52. doi: 10.1016/j.coph.2008.12.001
- Mackie, K. (2008). Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286, S60–S65. doi: 10.1016/j.mce.2008.01.022
- Martin-Garcia, E., Burokas, A., Martin, M., Berrendero, F., Rubi, B., Kiesselbach, C., et al. (2010). Central and peripheral consequences of the chronic blockade of CB1 cannabinoid receptor with rimonabant or taranabant. *J. Neurochem.* 112, 1338–13351. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06549.x
- Matias, I., and Di Marzo, V. (2007). Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 27–37. doi: 10.1016/j.tem.2006.11.006
- Matias, I., Léonhardt, M., Lesage, J., De Petrocellis, L., Dupouy, J. P., Vieau, D., et al. (2003). Effect of maternal under-nutrition on pup body weight and hypothalamic endocannabinoid levels. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 382–389. doi: 10.1007/s000180300031
- Matias, S. L., Dewey, K. G., Quesenberry, C. P. Jr., and Gunderson, E. P. (2014). Maternal prepregnancy obesity and insulin treatment during pregnancy are independently associated with delayed lactogenesis in women with recent gestational diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* 99, 115–121. doi: 10.3945/ajcn.113.073049
- Muhlhauser, B. S., Adam, C. L., Findlay, P. A., Duffield, J. A., and McMillen, I. C. (2006). Increased maternal nutrition alters development of the appetite-regulating network in the brain. *FASEB J.* 20, 1257–1259. doi: 10.1096/fj.05-5241fje
- Navarro, M., Hernández, E., Muñoz, R. M., del Arco, I., Villanúa, M. A., Carrera, M. R., et al. (1997). Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport* 8, 491–496.
- Niki, M., Jyotaki, M., Yoshida, R., Yasumatsu, K., Shigemura, N., DiPatrizio, N. V., et al. (2015). Modulation of sweet taste sensitivities by endogenous leptin and endocannabinoids in mice. *J. Physiol.* 593, 2527–2545. doi: 10.1113/JP270295
- Ong, Z. Y., and Muhlhauser, B. S. (2011). Maternal “junk-food” feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *FASEB J.* 25, 2167–2179. doi: 10.1096/fj.10-178392
- Peleg-Raibstein, D., Luca, E., and Wolfrum, C. (2012). Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. *Behav. Brain Res.* 233, 398–404. doi: 10.1016/j.bbr.2012.05.027
- Phillips, C. M., and Perry, I. J. (2015). Depressive symptoms, anxiety and well-being among metabolic health obese subtypes. *Psychoneuroendocrinology* 62, 47–53. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.07.168
- Pirkola, J., Pouta, A., Bloigu, A., Hartikainen, A. L., Laitinen, J., Järvelin, M. R., et al. (2010). Risks of overweight and abdominal obesity at age 16 years associated with prenatal exposures to maternal prepregnancy overweight and gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33, 1115–1121. doi: 10.2337/dc09-1871
- Rajasingam, D., Seed, P. T., Briley, A. L., Shennan, A. H., and Poston, L. (2009). A prospective study of pregnancy outcome and biomarkers of oxidative stress in nulliparous obese women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 200, 395.e1–395.e9. doi: 10.1016/j.ajog.2008.10.047
- Rasmussen, K. M., Hilson, J. A., and Kjolhede, C. L. (2001). Obesity may impair lactogenesis II. *J. Nutr.* 131, 3009S–11S.
- Rasmussen, K. M., and Kjolhede, C. L. (2004). Prepregnant overweight and obesity diminish the prolactin response to suckling in the first week postpartum. *Pediatrics* 113, e465–e471. doi: 10.1542/peds.113.5.e465
- Ravelli, A. C., van Der Meulen, J. H., Osmond, C., Barker, D. J., and Bleker, O. P. (1999). Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 811–816.
- Ravelli, G. P., Stein, Z. A., and Susser, M. W. (1976). Obesity in young men after famine exposure *in utero* and early infancy. *N. Engl. J. Med.* 295, 349–353. doi: 10.1056/NEJM197608122950701
- Reyes-Castro, L. A., Rodriguez, J. S., Charco, R., Bautista, C. J., Larrea, F., Nathanielsz, P. W., et al. (2012). Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.* 30, 39–45. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2011.10.002
- Rodríguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Fernández-Ruiz, J. J., Navarro, M., and Ramos, J. A. (1991). Effects of pre- and perinatal exposure to hashish extracts on the ontogeny of brain dopaminergic neurons. *Neuroscience* 43, 713–723. doi: 10.1016/0306-4522(91)90329-M
- Samuelsson, A. M., Matthews, P. A., Argenton, M., Christie, M. R., McConnell, J. M., Jansen, E. H., et al. (2008). Diet-induced obesity in female mice leads to

- offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension* 51, 383–392. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.101477
- Sasaki, A., de Vega, W. C., St-Cyr, S., Pan, P., and McGowan, P. O. (2013). Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. *Neuroscience* 240, 1–12. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.02.044
- Sasaki, A., de Vega, W., Sivanathan, S., St-Cyr, S., and McGowan, P. O. (2014). Maternal high-fat diet alters anxiety behavior and glucocorticoid signaling in adolescent offspring. *Neuroscience* 272, 92–101. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.04.012
- Shankar, K., Harrell, A., Liu, X., Gilchrist, J. M., Ronis, M. J., and Badger, T. M. (2008). Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R528–R538. doi: 10.1152/ajpregu.00316.2007
- Srinivasan, M., Katewa, S. D., Palaniyappan, A., Pandya, J. D., and Patel, M. S. (2006). Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E792–E799. doi: 10.1152/ajpendo.00078.2006
- Stachowiak, E. K., Srinivasan, M., Stachowiak, M. K., and Patel, M. S. (2013). Maternal obesity induced by a high fat diet causes altered cellular development in fetal brains suggestive of a predisposition of offspring to neurological disorders in later life. *Metab. Brain Dis.* 28, 721–725. doi: 10.1007/s11011-013-9437-8
- Stunkard, A. J., Faith, M. S., and Allison, K. C. (2003). Depression and obesity. *Biol. Psychiatry* 54, 330–337. doi: 10.1016/S0006-3223(03)00608-5
- Sullivan, E. L., Grayson, B., Takahashi, D., Robertson, N., Maier, A., Bethea, C. L., et al. (2010). Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring. *J. Neurosci.* 30, 3826–3830. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5560-09.2010
- Sullivan, E. L., Nousen, E. K., and Chamblou, K. A. (2014). Maternal high fat diet consumption during the perinatal period programs offspring behavior. *Physiol. Behav.* 123, 236–242. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.07.014
- Sullivan, E. L., Smith, M. S., and Grove, K. L. (2011). Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. *Neuroendocrinology* 93, 1–8. doi: 10.1159/000322038
- Taylor, P. D., McConnell, J., Khan, I. Y., Holemans, K., Lawrence, K. M., Asare-Anane, H., et al. (2005). Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, R134–R139. doi: 10.1152/ajpregu.00355.2004
- Valdez, R., Athens, M. A., Thompson, G. H., Bradshaw, B. S., and Stern, M. P. (1994). Birthweight and adult health outcomes in a biethnic population in the USA. *Diabetologia* 37, 624–631. doi: 10.1007/BF00403383
- Vickers, M. H., Breier, B. H., Cutfield, W. S., Hofman, P. L., and Gluckman, P. D. (2000). Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, E83–E87.
- Vickers, M. H., and Sloboda, D. M. (2012). Leptin as mediator of the effects of developmental programming. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 677–687. doi: 10.1016/j.beem.2012.03.005
- Vucetic, Z., Kimmel, J., and Reyes, T. M. (2011). Chronic high-fat diet drives postnatal epigenetic regulation of mu-opioid receptor in the brain. *Neuropsychopharmacology* 36, 1199–1206. doi: 10.1038/npp.2011.4
- Wenzel, D., Matthey, M., Bindila, L., Lerner, R., Lutz, B., Zimmer, A., et al. (2013). Endocannabinoid anandamide mediates hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 18710–18715. doi: 10.1073/pnas.1308130110
- White, C. L., Purpera, M. N., and Morrison, C. D. (2009). Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R1464–R1472. doi: 10.1152/ajpregu.91015.2008
- World Health Organization (2014). *Global Status Report of Non Communicable Diseases 2014*. Geneva: WHO Press; World Health Organization.
- Wright, T., Langley-Evans, S. C., and Voigt, J. P. (2011). The impact of maternal cafeteria diet on anxiety-related behaviour and exploration in the offspring. *Physiol. Behav.* 103, 164–172. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.01.008
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2016 Ramírez-López, Vázquez, Bindila, Lomazzo, Hofmann, Blanco, Alén, Antón, Decara, Ouro, Orió, Suarez, Lutz, Rodríguez de Fonseca and Gómez de Heras. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## 2.1.2 Datos complementarios al artículo 5

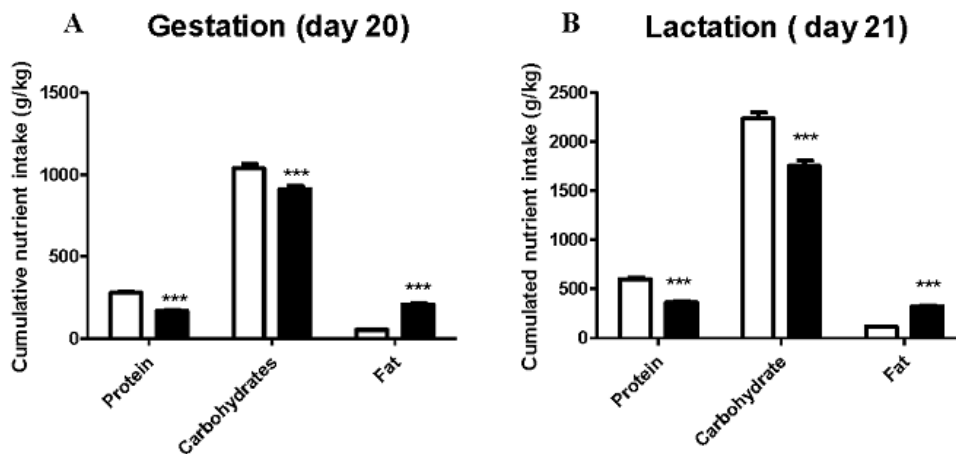
En este apartado se expone el material suplementario publicado junto al **artículo 5**, así como algunos resultados no publicados que resultan importantes porque permiten comparar los resultados con el modelo de dieta materna restringida y/o abordan parte de los objetivos específicos planteados, como por ejemplo la evaluación del dimorfismo sexual.

### 2.1.2.1 Material suplementario del artículo 5

Junto al **artículo 5**, se publicaron las figuras: *supplementary figure 1*, *supplementary figure 2* y *supplementary figure 3*, que se exponen a continuación.

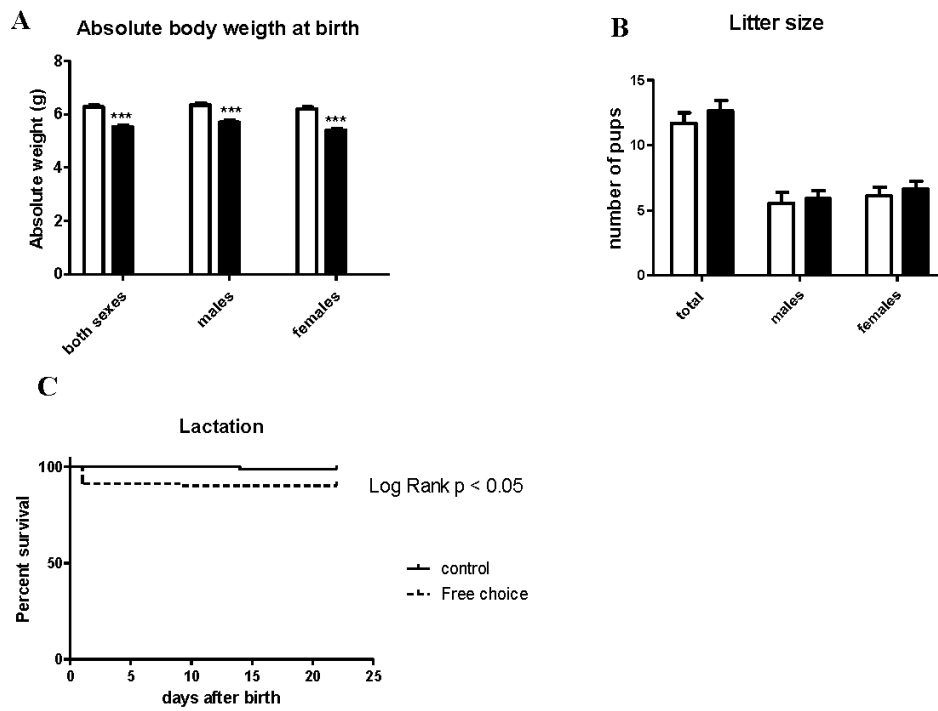
#### Supplementary Figure 1. Nutritional intake of dams during pregnancy and lactation

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ . Cumulative intake (g/kg) of proteins, carbohydrates and fats in control (open bars) and free-choice (solid bars) dams at gestational day 20 gestation (A) and at lactation day 21 (B).



### Supplementary Figure 2. Birth outcomes and mortality rate

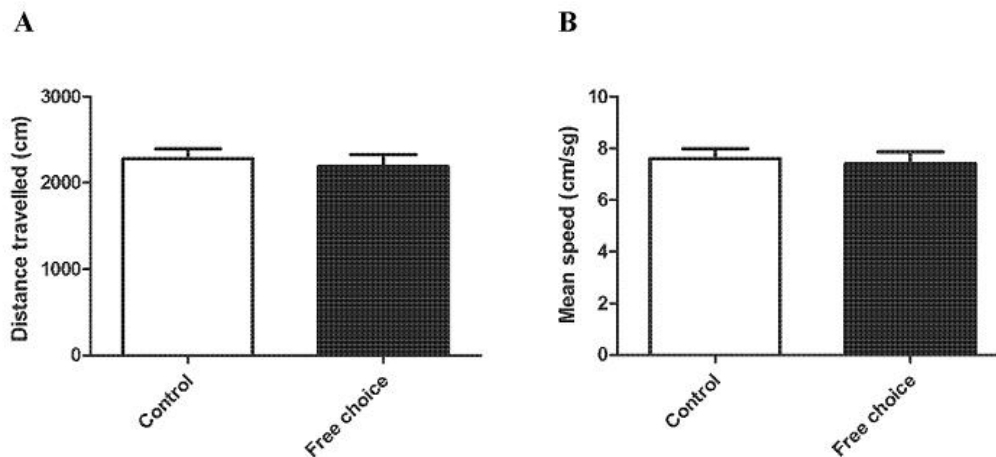
Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0.001$ . Absolute body weight (g) (A) and litter size (B) at birth of offspring from control (open bars) and free-choice (solid bars) dams. Weight and size is shown for the total number of pups as wells as separately for male and female pups (A, B). Survival curve during lactation (C).





### Supplementary Figure 3. Exploratory and locomotor activity in the open field test in adolescent male offspring

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Total distance travelled (A) and mean speed (B) in offspring from control (open bars) and free-choice (solid bars) dams.



#### 2.1.2.2 Impacto de la dieta materna hipercalórica en parámetros relacionados con la fertilidad.

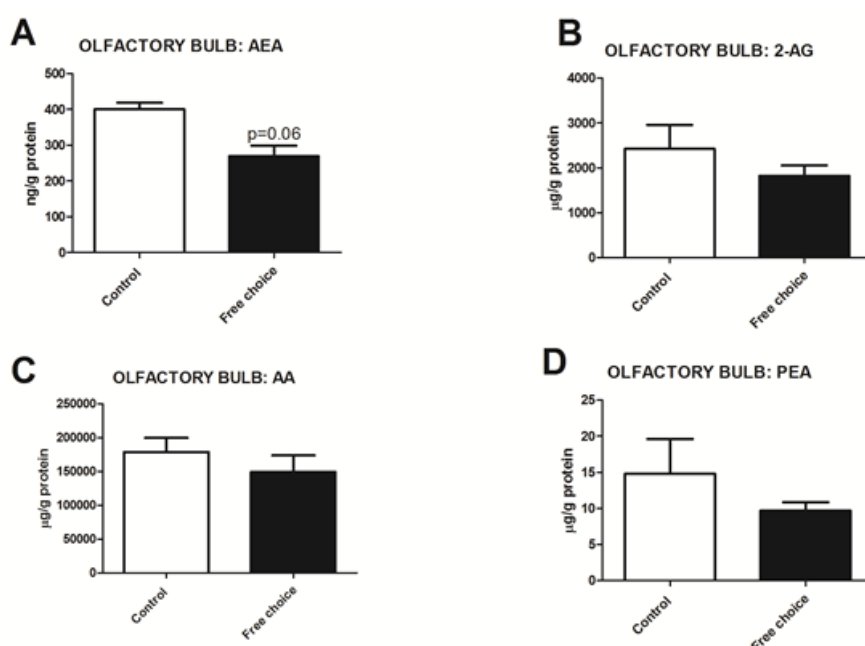
En las hembras expuestas a dieta hipercalórica/altamente palatable se evaluó el ciclo estral durante el periodo preconcepcional (dos semanas previas al apareamiento), con el fin de evaluar si la dieta impactaba en la regularidad y duración de los diferentes estadios del ciclo estral. Se encontró que antes del apareamiento 6 ratas de las 11 asignadas al grupo de dieta libre elección presentaban alteraciones en la regularidad del ciclo y/o prolongado diestro. Específicamente el test de chi cuadrado mostró diferencias significativas entre los grupos perinatales ( $X^2_{df1}=4.105$ ,  $p<0.05$ ).

Con respecto al número de días necesarios para obtener la gestación, aunque 7 de las 11 ratas asignadas al grupo de libre elección pasaron más de dos días con el macho en fase de proestro para conseguir la gestación, el test de chi cuadrado no mostró diferencias entre los grupos ( $X^2_{df1}=1.818$ ,  $p>0.05$ ). Específicamente, se consiguió gestación en el 100% total de animales cruzados.

Estos datos ponen de manifiesto que la dieta materna hipercalórica, aunque puede afectar a algunos parámetros del ciclo estral, no disminuye la fertilidad (datos no mostrados).

### 2.1.2.3 Efecto de la dieta materna hipercalórica altamente palatable en los niveles cerebrales de endocannabinoides y N-aciletanolaminas en el bulbo olfatorio de las crías macho

Se cuantificaron los niveles de endocannabinoides y N-aciletanolaminas en el bulbo olfatorio derecho de las crías machos a través de LC/MS. El test U Mann Whitney mostró que las crías procedentes de las madres expuestas a la dieta hipercalórica y altamente palatable presentaban una tendencia casi significativa a presentar menores niveles de AEA en el bulbo olfatorio ( $U=2.0$ ,  $p=0.06$ ) (*Figura complementaria 3A*). No se encontraron diferencias en los niveles de 2-AG, AA ni en PEA (*Figura complementaria 3B-D*). Por tanto, en esta estructura vinculada a la conducta de la ingesta, los datos muestran la misma tendencia a la baja en los niveles de endocannabinoides ya discutida en el artículo 1 (*artículo 1, figura 4*).



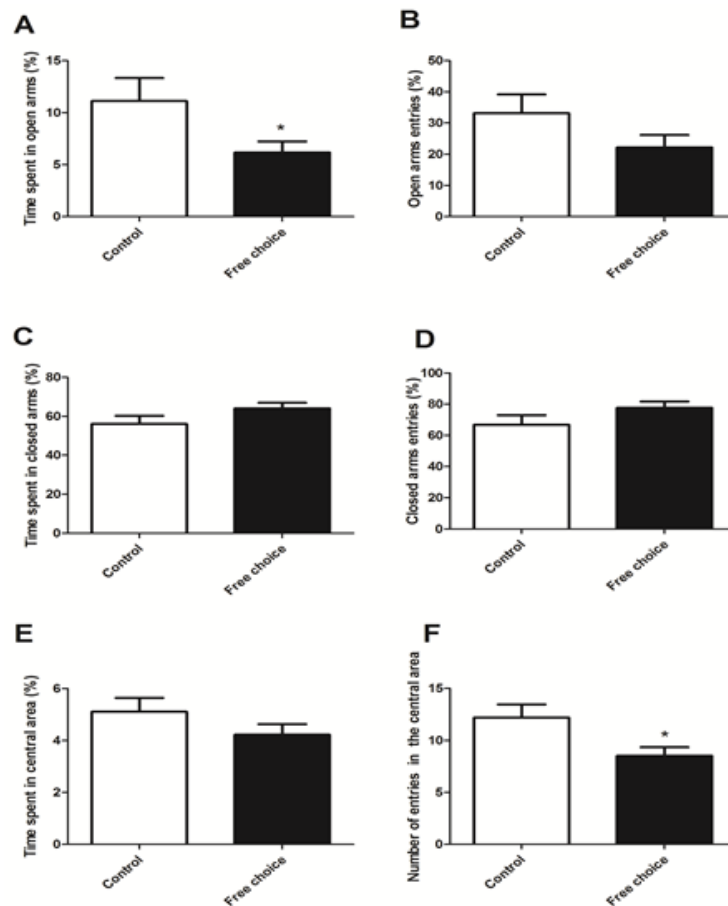
*Figura complementaria 3.* Niveles de endocannabinoides y lípidos relacionados en el bulbo olfatorio de los animales expuestos a dieta hipercalórica. Niveles de anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG) (gráficos A-B), ácido araquidónico (gráfico C) y palmitoyletanolamida (gráfico D) en las crías macho expuestas a dieta control (barras blancas) o a dieta hipercalórica de libre elección o “free choice” (barras negras). Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM.

#### 2.1.2.4 Efecto de la dieta materna hipercalórica en las respuestas conductuales de la descendencia hembra

Se especifican los resultados de igual modo se han mostrado en la descendencia macho del **artículo 5**.

##### 2.1.2.4.1 *Evaluación de las conductas relacionadas con la ansiedad en la descendencia hembra*

Para evaluar las respuestas relacionadas con la ansiedad se empleó el laberinto en cruz elevado (*Elevated plus maze*) y el test de campo abierto (*Open field test*). Los test fueron realizados en el periodo adolescente. Se encontró que las hembras expuestas a una dieta materna hipercalórica y altamente palatable (*free choice*) presentaban más respuestas relacionadas con la ansiedad. En concreto pasaban menos tiempo en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado ( $t=2.271, p<0.05$ ) (**figura complementaria 4A**) y entraban menos veces a la zona central del campo abierto ( $t=2.483, p<0.05$ ) (**figura complementaria 4F**). A diferencia de los machos expuestos a la misma dieta (**artículo 5, figura 6**), no presentaban alteraciones en el tiempo que permanecían en los brazos cerrados, ni en el número de entradas en las distintas áreas del laberinto en cruz elevado, así como en el tiempo pasado en la zona central del campo abierto (**figura complementaria 4B-E**). En conjunto estos datos evidencian una conducta ligeramente más ansiosa en las hembras expuestas a la dieta hipercalórica y altamente palatable en el periodo perinatal con respecto a los controles. Sin embargo, la conducta ansiosa mostrada por las mismas parece menos intensa que la de los machos expuestos a la misma dieta (**artículo 5, figura 6**), dado el menor número de respuestas relacionadas con la ansiedad exhibidas por éstas.



**Figura complementaria 4.** Conductas relacionadas con la ansiedad en la descendencia hembra expuesta a dieta hipercalórica. Se evaluaron a través del test del laberinto en cruz elevado y del test de campo abierto durante el periodo adolescente. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. Actividad en el laberinto en cruz elevado (A-D). Respuestas en el test de campo abierto (E-F). Las barras blancas se refieren a los animales expuestos a dieta control perinatalmente mientras que las barras negras indican la actividad de los animales expuestos a dieta hipercalórica (“free choice”). \*:  $p < 0.05$ .

#### 2.1.2.4.2 Evaluación de la respuesta locomotora en la descendencia hembra

La respuesta locomotora se estimó evaluando la distancia recorrida y velocidad media en el test de campo abierto realizado en el periodo adolescente. El test de la t de Student no mostró diferencias entre los dos tipos de dietas perinatales en las variables estudiadas, lo que indica que la dieta perinatal no afecta a la respuesta locomotora (datos no mostrados). Estos resultados son similares a los encontrados en la descendencia macho (**artículo 5**).

## 2.2 Efecto de la dieta materna hipercalórica: Impacto en el sistema endocannabinoide de la descendencia en la etapa adulta

### 2.2.1 Artículo 6

*Exposure to a highly caloric palatable diet during the perinatal period affects the expression of the endogenous cannabinoid system in the brain, liver and adipose tissue of adult rat offspring.*

En este artículo se analizan los efectos a largo plazo de la dieta materna hipercalórica y altamente palatable, tanto en la descendencia macho como en la hembra, en las conductas relacionadas con el sistema endocannabinoide, metabolismo y expresión génica de ciertos componentes del sistema endocannabinoide y reguladores del metabolismo. Específicamente, se evalúan los efectos de la dieta y el dimorfismo sexual en los parámetros de crecimiento e ingesta calórica durante todo el periodo de estudio. Se analizan las diferencias según dieta perinatal y sexo en la conducta de la ingesta y preferencias por comidas a través del test de ingesta compulsiva y se analiza la respuesta diferencial tras la administración aguda de un antagonista cannabinoide, el AM251. Se asocian esos resultados con la preferencia por chocolate que tenían las madres en el periodo perinatal. En la etapa adulta se analiza la adiposidad perirrenal y perigonadal, los metabolitos plasmáticos y leptinemia de forma diferencial. Por primera vez, se estudia el impacto de la dieta materna hipercalórica implementada únicamente en el periodo perinatal en la expresión de distintos componentes del sistema endocannabinoide y otros genes relacionados con el metabolismo en hipotálamo, hígado y tejido adiposo en la etapa adulta. Los resultados enfatizan que la exposición a una dieta materna hipercalórica altamente palatable altera los parámetros de crecimiento, la conducta de la ingesta y preferencia por comidas e incrementa el riesgo de padecer características del síndrome metabólico en la etapa adulta. Estas alteraciones fenotípicas se asocian a alteraciones en la expresión de genes del

sistema endocannabinoide y genes relacionados con el metabolismo y además se expresan de forma diferente en función del sexo.

## RESEARCH ARTICLE

# Exposure to a Highly Caloric Palatable Diet during the Perinatal Period Affects the Expression of the Endogenous Cannabinoid System in the Brain, Liver and Adipose Tissue of Adult Rat Offspring

María Teresa Ramírez-López<sup>1</sup>, Raquel Arco<sup>2</sup>, Juan Decara<sup>2</sup>, Mariam Vázquez<sup>2</sup>, Rosario Noemí Blanco<sup>1</sup>, Francisco Alén<sup>2</sup>, Juan Suárez<sup>2</sup>, Raquel Gómez de Heras<sup>1\*</sup>, Fernando Rodríguez de Fonseca<sup>2\*</sup>

**1** Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid, Campus de Somosaguas s/n, 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain, **2** Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga, Universidad de Málaga, 29010, Málaga, Spain

\* [fernando.rodriguez@ibima.eu](mailto:fernando.rodriguez@ibima.eu) (FRF); [rgomezhe@psi.ucm.es](mailto:rgomezhe@psi.ucm.es) (RGH)



CrossMark  
click for updates

## OPEN ACCESS

**Citation:** Ramírez-López MT, Arco R, Decara J, Vázquez M, Noemí Blanco R, Alén F, et al. (2016) Exposure to a Highly Caloric Palatable Diet during the Perinatal Period Affects the Expression of the Endogenous Cannabinoid System in the Brain, Liver and Adipose Tissue of Adult Rat Offspring. *PLoS ONE* 11(11): e0165432. doi:10.1371/journal.pone.0165432

**Editor:** Miguel López, Universidade de Santiago de Compostela, SPAIN

**Received:** August 1, 2016

**Accepted:** October 11, 2016

**Published:** November 2, 2016

**Copyright:** © 2016 Ramírez-López et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** The data are all contained within the paper and Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III UEDR-FEDER, Ministerio de Economía y Competitividad UE/ERDF (PI13/0226 to F.R.F., CP12/03109 to J.S. and PSI-2012-35388 to R.G.H.), Red de Trastornos Adictivos UE/ERDF (RD12/0028/0001 to F.R.F.), CIBERobn, Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de

## Abstract

Recent studies have linked gestational exposure to highly caloric diets with a disrupted endogenous cannabinoid system (ECS). In the present study, we have extended these studies by analyzing the impact of the exposure to a palatable diet during gestation and lactation on a) the adult expression of endocannabinoid-related behaviors, b) the metabolic profile of adult offspring and c) the mRNA expression of the signaling machinery of the ECS in the hypothalamus, the liver and the adipose tissue of adult offspring of both sexes. Exposure to a palatable diet resulted in a) sex-dimorphic and perinatal diet specific feeding behaviors, including the differential response to the inhibitory effects of the cannabinoid receptor inverse agonist AM251, b) features of metabolic syndrome including increased adiposity, hyperleptinemia, hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia and c) tissue and sex-specific changes in the expression of both CB1 and CB2 receptors and in that of the endocannabinoid-degrading enzymes FAAH and MAGL, being the adipose tissue the most affected organ analyzed. Since the effects were observed in adult animals that were weaned while consuming a normal diet, the present results indicate that the ECS is one of the targets of maternal programming of the offspring energy expenditure. These results clearly indicate that the maternal diet has long-term effects on the development of pups through multiple alterations of signaling homeostatic pathways that include the ECS. The potential relevance of these alterations for the current obesity epidemic is discussed.

Andalucía, UE/ERDF (PI45403, CTS-8221, CTS-433 to F.R.F.), Consejería de Salud, Junta de Andalucía (PI0232/2008, PI0029/2008 and SAS111224 to J.S. and F.R.F. M.T. Ramírez-López has been funded by a FPU predoctoral fellowship of the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (AP-2009-0225); J.S. holds "Miguel Servet" research contract from the National System of Health, ISCIII (grant numbersCP12/03109).

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Obesity and metabolic syndrome prevalence are increasing worldwide [1,2]. Although lifestyle factors contribute to this epidemic, it is becoming clear that nutritional conditions during critical windows of development, including the perinatal period, could impact the future health of offspring and increase the risk of metabolic diseases [3–5]. This phenomenon has been defined as nutritional programming [6].

Furthermore, it is well-known that maternal and postnatal nutrition tends to be excessive in Western societies. Based on this consideration, human and animal studies have focused on the effect of overnutrition during the perinatal period and the disease susceptibility of offspring later in life [7–12]. Specifically, maternal exposure to hypercaloric diets has been linked to the development of features of metabolic syndrome in offspring such as increased adiposity, glucose, insulin and lipid metabolism alterations or higher blood pressure [8,10,11,13]. Additionally, sexual dimorphism has been documented after maternal exposure to inadequate diets. Thus, a maternal high-fat diet or perinatal exposure to junk food modifies the metabolic outcomes and the gene expression profile of several metabolism-related genes in a sex-specific manner [12–14].

On the other hand, food preferences have been found to be altered after maternal exposure to specific diets as well. For instance, it has been reported that exposure to junk food during pregnancy, especially when the mother actively chooses this type of food, increases the preference for this type of food later in life [15,16]. This fact might help aggravate the health outcomes previously documented. Indeed, it has been shown that the metabolic phenotype reported after being exposed to an adverse nutritional environment during the perinatal period seems to be exacerbated when inadequate nutritional conditions carry over to the postweaning period [8,9,13].

Several mechanisms have been identified as key factors in this process of malprogramming. They include leptin dysregulation [17], epigenetic phenomena [18], alterations in the hypothalamic neuropeptides [19] or modifications in opioid and dopamine signaling of the central reward system [16,18]. Additional mechanisms might contribute to these mediators. Among them is the endocannabinoid system (ECS), which keeps important modulatory relations with the above cited homeostatic mechanisms involved in feeding and metabolic homeostasis [20,21]. However, to date its role in nutritional programming has not been well characterized.

The ECS is a lipid signaling system composed by endogenous ligands (mainly anandamide (AEA) and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG), which are direct arachidonic acid/indirect linoleic acid derivatives. The ECS is also comprised of the cannabinoid receptors (CB1 and CB2) and the enzymes required for their synthesis and degradation such as fatty acid amide hydrolase (FAAH), *N*-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD), diacylglycerol lipases (DAGL $\alpha$  and DAGL $\beta$ ) and monoacylglycerol lipase (MAGL) [22,23].

The ECS plays a pivotal role in brain development, which is particularly critical in important processes such as cell proliferation, lineage fate decisions, phenotypic acquisition, migration or synaptogenesis [24]. Moreover, the ECS is involved in the modulation of food intake and energy homeostasis through central and peripheral mechanisms [25,26]. Indeed, their receptors are widely expressed in important areas regulating feeding behavior and metabolism which include the hypothalamus, the central reward system, liver or adipose tissue [26,27]. Furthermore, the ECS is implicated in the regulation of food preferences and in the perception of palatability. For instance, the cannabinoids enhance sweet responses in taste receptor cells whereas the CB1 inverse agonist AM251 reduces this response [28]. Additionally, pharmacological CB1 receptor blockade could decrease the motivation to obtain highly palatable food when a free choice between two types of food is made possible [29,30]. Thus, the ECS favors feeding behavior, especially for dense-caloric and palatable foods.



The ECS promotes energy storage, decreases energy expenditure [26] and is sensible to dietary modifications. Its hyperactivation has been associated to obesity and metabolic syndrome [31]. Furthermore, hypercaloric diets have been linked to alterations in the expression and density of several components of the ECS in the brain and peripheral tissues. Thus, access to a highly palatable diet could modify the expression and density of CB1 receptors in specific brain regions [32]. It has been also demonstrated that a chronic high-fat diet exposure alters the levels of endocannabinoids and their metabolic enzymes in the pancreas and adipose tissue [33]. Moreover, dietary fatty acids can modify the levels of endocannabinoids in the brain and peripheral organs [34,35].

Considering the importance of the ECS in food intake, energy balance, neurodevelopment and its role in the pathophysiology of metabolic diseases, it has been proposed that the ECS could play an important role in the process of nutritional programming [24]. Thus, an inadequate maternal diet results in a disruption of endocannabinoid signaling at birth, and these changes appear to have long-lasting consequences [36]. However, it is unknown whether the ECS components could be affected later in life after only being exposed to an inadequate maternal diet during the perinatal period.

Given this background, we aim to study the contribution of the ECS in early life programming. Accordingly, we addressed the effect of maternal exposure to a highly palatable diet in male and female offspring that were weaned on a standard diet. Changes in body weight and food intake over time were monitored after weaning. Metabolic parameters in plasma and adiposity were also studied at adulthood. Additionally, the feeding behavior and food preferences of these animals were evaluated when highly palatable food was available for a short period of time. For the first time, we evaluated the expression of several components of the ECS in metabolically relevant tissues such as the hypothalamus, liver and perirenal adipose tissue in adult animals, which were only exposed to a highly palatable diet during the perinatal period. The expression of lipogenic genes and *Ppars* genes was also measured. We hypothesize that perinatal exposure to an inadequate diet could program feeding behavior, metabolic parameters and affect several components of the ECS at adulthood, even though animals were weaned on a standard chow diet. We also proposed that these alterations could be expressed in a sex-specific manner and may increase the vulnerability to develop metabolic diseases later in life.

## Materials and Methods

### Animals, diets and experimental design

The Animal Ethics Committee of the Complutense University of Madrid approved this study. Additionally, it followed the European Directive 2010/63/EU in accordance with the current Spanish regulations (RD 53/2013 and 178/200) on the protection of animals used for scientific purposes.

The perinatal protocol was carried out as previously reported [36]. Initially, experiments were performed in prepubertal female Wistar rats (Harlan, Barcelona, Spain). They were handled, individually housed, and randomly assigned to control (n = 9) or free-choice diet (n = 11), after three weeks of acclimatization.

Control rats (C) received standard chow *ad libitum* (standard chow SAFE A04, Panlab, Barcelona, Spain). In contrast, free-choice rats (P) were allowed to choose between standard rat chow (standard chow SAFE A04, Panlab, Barcelona, Spain) and a highly palatable food composed of a mixture of chocolates, *ad libitum* as well. The mixture of chocolate food was composed of a homogenous mixture of Mars<sup>®</sup>, Snickers<sup>®</sup>, Bounty<sup>®</sup> and Milka<sup>®</sup> in equal proportions as previously described [37,38]. A detailed nutritional composition of both types of food is shown in S1 Table. All female rats kept the same experimental diet during the perinatal

period. This period included pregestation (from the beginning of the experiment to eight weeks prior to mating), mating, the gestational period and lactation.

Eight weeks after assigning the type of diet, females were allowed to mate with males of the same strain. Successful mating was confirmed by the presence of a vaginal plug or spermatozoa in the vaginal smear the following morning. The day of birth was defined as postnatal day 0 (PN day 0), pups were weighed, sexed and litters were culled to 8 pups, consisting of 4 males and 4 females. During the lactation period, the weight of every pup was recorded three days per week.

At PN day 22–23, offspring from both animal groups were weaned and exposed to standard chow diet (male offspring:  $n = 15$  and  $n = 17$  for control (CC) and free-choice (PC) perinatal diet groups, respectively; female offspring:  $n = 18$  and  $n = 23$  for control (CC) and free-choice (PC) perinatal groups respectively). Rats from the same sex, litter and perinatal diet group were housed together (2–3 rats/cage) where possible. In order to minimize the estrous cycle-related variability, the female rats were closely housed in the same and adjacent cages, and randomly distributed among the different experimental groups [39–41]. Moreover, males were housed in a separate room.

During the post-weaning period, weight and food intake were measured weekly. Behavioral studies to evaluate food intake and food preferences were performed in adolescence and adulthood. At the 5<sup>th</sup> postnatal month, three quarters of the male offspring were sacrificed. Then, the perirenal and perigonadal fat were removed to estimate adiposity. Additionally, the whole brain, plasma and samples from perirenal fat and liver were collected for further analysis (Fig 1). To avoid litter effects, samples from at least three litters per perinatal group were used in all determinations.

All animals were maintained at a 12h light-dark cycle with temperature of  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  and were given free access to food and water. The criteria described by Vickers were used to refer to different age stages [42].

## Evaluation of caloric intake and chocolate preference

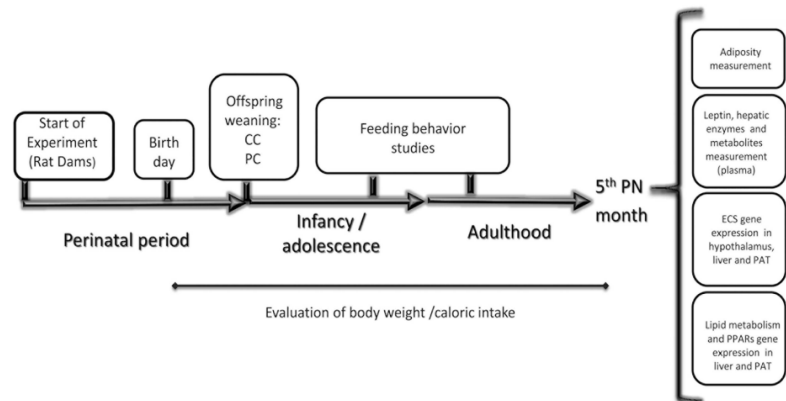
Food intake was determined by subtracting the amount of each food type left in the cage from the total amount of food provided. To calculate individual food intake when animals were housed in groups, total food intake from each cage was measured and equally divided according to the number of pups per cage. Comparisons among groups were performed by calculating cumulative caloric intake (Kcal/Kg) as well as absolute body weight in each period of the study.

In rat dams assigned to a free choice diet, the chocolate preference during the perinatal period was evaluated. Chocolate preference was calculated as the percentage of chocolate intake over total food provided. The average of chocolate preference in pre-gestation (three weeks prior to mating), gestation (21 days) and lactation (22 days) was recorded and used to compare the chocolate preference between the different perinatal periods.

## Feeding behavior studies

**Compulsive feeding test.** An adaptation of the Compulsive Feeding Test described by Heyne et al. [38] was adopted to assess the feeding behavior after rats are given a free choice between a mixture of chocolates and standard chow food for a limited and unlimited time. This test allows measuring food intake and chocolate preference [38]. The test was performed at adolescence (8–9 postnatal weeks) and it was reevaluated at adulthood (12–13 postnatal weeks) in both perinatal groups and both sexes.

At the beginning of the test, the rats were individually housed. They were then provided with the two types of food and water *ad libitum* during day 1 and 2. In day 3 and 4, they had



**Fig 1. Experimental design.** Offspring from rat dams assigned to the experimental diets were studied during different stages of development. After weaning (PN day 22–23), all offspring were exposed to a standard chow diet. Feeding behavior studies (Compulsive Feeding Test and AM251 test) were performed during adolescence and/or adulthood. At the 5<sup>th</sup> PN month, offspring were sacrificed and adiposity was assessed. Leptinemia and plasma metabolites were also studied. Additionally, the characterization of the ECS, lipid metabolism and PPARs gene expression was evaluated in metabolically-relevant tissues (hypothalamus, liver and PAT). The evolution of body weight and caloric intake was assessed until adulthood (5<sup>th</sup> PN month).

doi:10.1371/journal.pone.0165432.g001

limited chocolate access (only one hour during the light phase) with standard chow food and water *ad libitum*. At the end of the test, animals were returned to their cages and diets. Caloric intake relative to body weight and chocolate preference (calculated as the percentage of chocolate intake on overall intake) during the test were evaluated in both perinatal groups and sexes and in the two different age periods (adolescence and adulthood).

**AM251 test: determination of the effect of an acute dose of AM251 on caloric intake of two different types of food in offspring.** At adulthood (13–14 postnatal weeks), the differential response to AM251 (an inverse agonist of CB1 receptors) and its effect on caloric intake of two different types of food (standard chow and chocolate mixture) was evaluated. The experiment was performed in both perinatal groups and sexes following a similar procedure to the previously described [43,44]. The day before the test, all animals were food-deprived for 20 hours. At the beginning of the test, the rats received AM251 or vehicle. AM251 (Tocris, Bioscience, Bristol, UK) was dissolved in a vehicle of 5% Tween 80 and 95% of saline and was administered intraperitoneally (i.p.) at a dose of 3 mg/kg. Thirty minutes after administering the compound, animals were placed in an individual cage without bedding material. Then, they were provided with two small cans containing both types of weighed food: standard chow pellets and highly palatable food pellets (composed by the mixture of chocolates described above). Cumulative caloric intake relative to body weight of both types of food and the sum of both (total food intake) were calculated for 240 minutes after the beginning of the test.

### Sample collection

At the 5<sup>th</sup> postnatal month, animals from both sexes and experimental groups were weighed immediately before death. Then, they were sacrificed by decapitation after administration of Equitesin<sup>®</sup> (i.p.) (3 mg/kg). This process was carried out in the 2 following hours after the beginning of the dark phase in a separate room from the other experimental animals. Trunk blood samples were briefly collected into tubes containing EDTA (6%) and centrifuged (1500 g

for 10 minutes at 4°C). The clear layer of plasma was removed, frozen and stored at –80°C for biochemical and hormonal analysis. White perirenal and perigonadal fat were removed and weighed. The weights of the individual fat depots were used to determine the total abdominal fat mass. The whole brain was also removed and immediately frozen in isopentane and stored at –80°C. Then, the hypothalamus was sectioned according to the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1998) [45] by a punch done at coronal planes, and immediately processed for mRNA isolation. The hypothalamic area analyzed was ventral to the thalamus, caudal to preoptic area and dorsal to the mammillary bodies. Additionally, samples from perirenal adipose tissue (PAT) and liver were dissected and immediately frozen at –80°C until RT-qPCR analysis.

### Measurement of metabolites, hepatic enzymes and leptin in plasma

The following plasma metabolites were measured: basal glucose, triglycerides, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), urea, bilirubin, alkaline phosphatase (ALKP), and the hepatic enzymes alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and gamma-glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ GT). These metabolites were analyzed using commercial kits according to the manufacturer's instructions and a Hitachi 737 Automatic Analyzer (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan). Very low-density lipoprotein (VLDL) was estimated following the Friedewald equations [46] and low-density lipoprotein (LDL) was determined by the modification of Friedewald equation proposed by Ahmadi et al. [47]: (VLDL = TG/5); LDL = [(TChol/1.19)+(TG/1.9)-(HDL/1.1)-38]. The leptin levels in plasma were measured using a commercial rat insulin ELISA kit (Cat. no. RD291001200R; BioVendor, Brno, Czech Republic).

### Measurement of body composition

Adiposity was estimated by calculating the percentage of abdominal fat weight over total body weight before sacrifice. The perirenal and perigonadal fat deposits were dissected and weighed as previously described. The sum of both types of fat was used to determine the percentage of abdominal fat.

### RNA isolation and real-time quantitative PCR analysis

We performed real-time qPCR (TaqMan, Life Technologies) as described previously [48]. Tissue portions (100–300 mg) of the liver, PAT and the whole hypothalamus were homogenized. RNA was extracted using the Trizol<sup>®</sup> method according to the manufacturer's instruction (Gibco BRL Life Technologies). Reverse transcription was carried out from 1  $\mu$ g of RNA using the Transcriptor Reverse Transcriptase kit and random hexamer primers (Transcriptor RT, Roche). Real-time qPCR was performed using a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). The primers used were obtained based on TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays and the FAM™ dye label format (Life Technologies). Primers for the PCR reaction (S2 Table) were obtained based on Applied Biosystems' genome database of rat mRNA references (<http://bioinfo.appliedbiosystems.com/genome-database/gene-expression.html>). Absolute values from each sample were normalised with regard to the housekeeping gene *Actb*. The relative quantification was calculated using the  $\Delta\Delta$ Ct method and normalised to the control group.

### Statistical analysis

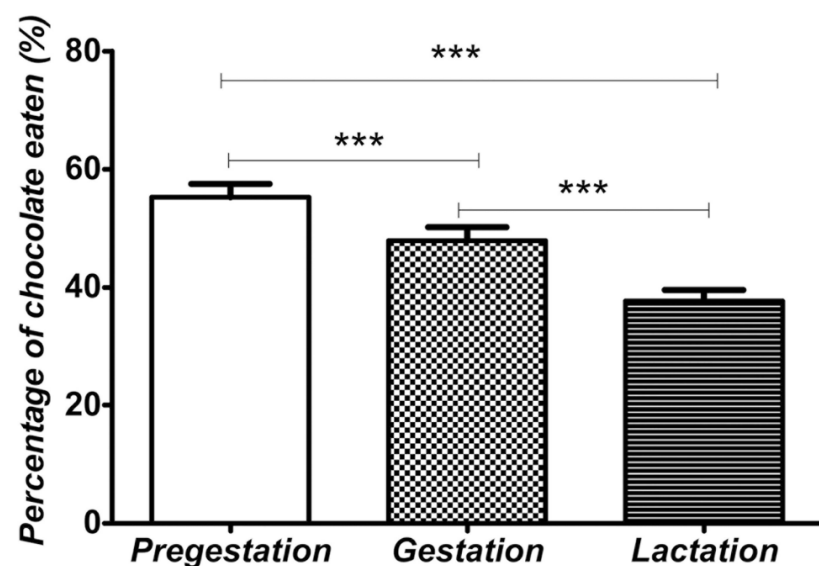
All data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical analysis of results was performed by using the GraphPad Prism version 6.0 program (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and

SPSS 20.0 for windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Absolute body weight over time and caloric intake were analyzed by three-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) with time, perinatal diet and sex as factors. Multiple comparisons were assessed by Bonferroni *post-hoc* test. Results from the compulsive feeding test were analyzed by three-way repeated measures ANOVA with perinatal group (control vs free-choice animals), sex and time as factors. Data from the AM251 test were analyzed by two-way ANOVA with treatment and perinatal diet as factors. Further analyses were performed by using one or two-way ANOVA, with perinatal diet and sex as variables, followed by Bonferroni *post-hoc* test for multiple comparisons. A *p*-value below 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Evaluation of the rat dams' preference for a highly palatable food

Rat dams assigned to a free choice diet were evaluated to assess the average of chocolate preference during pregestation, gestation and lactation. The chocolate preference between the three periods was compared. The one-way ANOVA showed that chocolate preference was significantly different between the periods studied ( $F_{2,20} = 54.699, p < 0.001$ ) (Fig 2). Specifically, Bonferroni multiple comparisons showed that chocolate preference in the pregestational period was higher than chocolate preference during the gestational period ( $t = 4.347, p < 0.001$ ) and lactation period ( $t = 10.41, p < 0.001$ ). Additionally, chocolate preference in gestation was higher than chocolate preference in lactation ( $t = 10.23, p < 0.001$ ). These data indicate that the preference for a highly palatable food in rat dams assigned to free choice was modified during the perinatal period. Thus, chocolate preference was reduced in gestation. Furthermore, the lowest chocolate preference was reached during the lactation period (Fig 2).

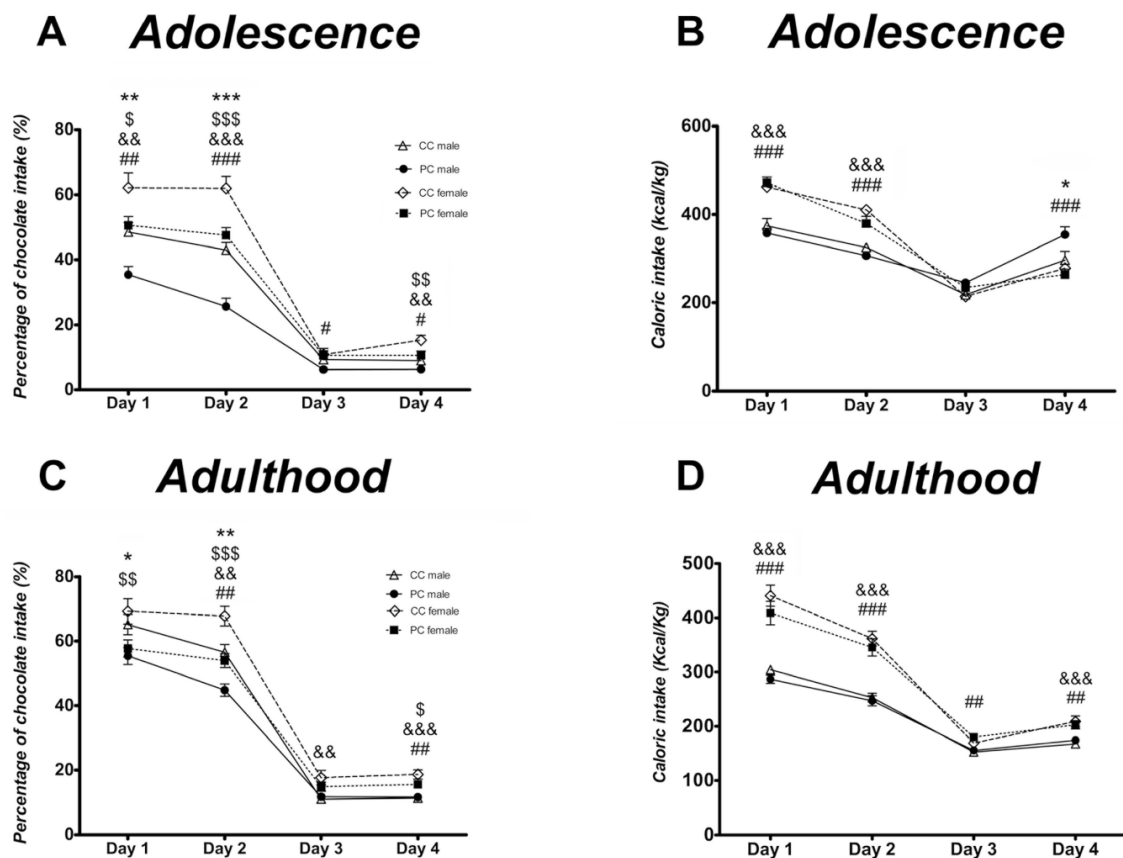


**Fig 2. Chocolate preference in rat dams assigned to free choice diet.** The bars indicate the average of chocolate preference during every perinatal period (pregestation, gestation and lactation). Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA of repeated measures. Bonferroni multiple comparisons indicated significantly differences between groups: \*\*\*  $p < 0.001$ .

doi:10.1371/journal.pone.0165432.g002

### Evaluation of feeding behavior and food preferences in offspring

**Compulsive feeding test.** Regarding adolescence and chocolate preference (Fig 3A), a three-way repeated measures ANOVA indicated a main effect of time ( $F_{3,58} = 401.884$ ,  $p < 0.001$ ), perinatal diet ( $F_{1,60} = 26.463$ ,  $p < 0.001$ ) and sex ( $F_{1,60} = 43.511$ ,  $p < 0.001$ ). Bonferroni multiple comparisons indicated that the offspring from P dams preferred chocolate less than the control offspring in both sexes ( $F_{1,60} = 14.482$ ,  $p < 0.001$  and  $F_{1,60} = 11.987$ ,  $p < 0.01$ , for male and female offspring respectively). Moreover, female offspring displayed higher chocolate preference than male offspring in both perinatal groups ( $F_{1,60} = 17.002$ ,  $p < 0.001$  and  $F_{1,60} = 28.071$ ,  $p < 0.001$ , for control and free choice perinatal diet respectively). Interaction between time, perinatal diet and sex were not significant. However, the Bonferroni test indicated that differences between male CC and male PC were significant the days with free access to chocolate (days 1 and 2) whereas the differences between female CC and female PC were significant on day 4 as



**Fig 3. Compulsive feeding test.** A,B: chocolate preference and caloric intake during the days of compulsive feeding test at adolescence. C,D: chocolate preference and caloric intake during the days of compulsive feeding test at adulthood. Control male offspring are represented as open triangles, control female as open rhombuses; free choice male offspring represented as solid circles and free choice female offspring as solid squares. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Three-way repeated measures ANOVA (time, sex and perinatal diet as factors) and Bonferroni *post-hoc* test: \*/\*\*/\*\*\*  $p < 0.05/0.01/0.001$  to compare CC vs PC males; \$/\$/\$\$\$  $p < 0.05/0.01/0.001$  to compare CC vs PC females; &/&&/&&&  $p < 0.01/0.001$  to compare CC males vs females; #/###/###  $p < 0.05/0.01/0.001$  to compare PC males vs females.

doi:10.1371/journal.pone.0165432.g003

well (when rats had limited access to highly palatable food). Additionally, female offspring showed higher preference for chocolate than male offspring every day of the test in the free choice group, and 3 days of the test in the control group (Fig 3A).

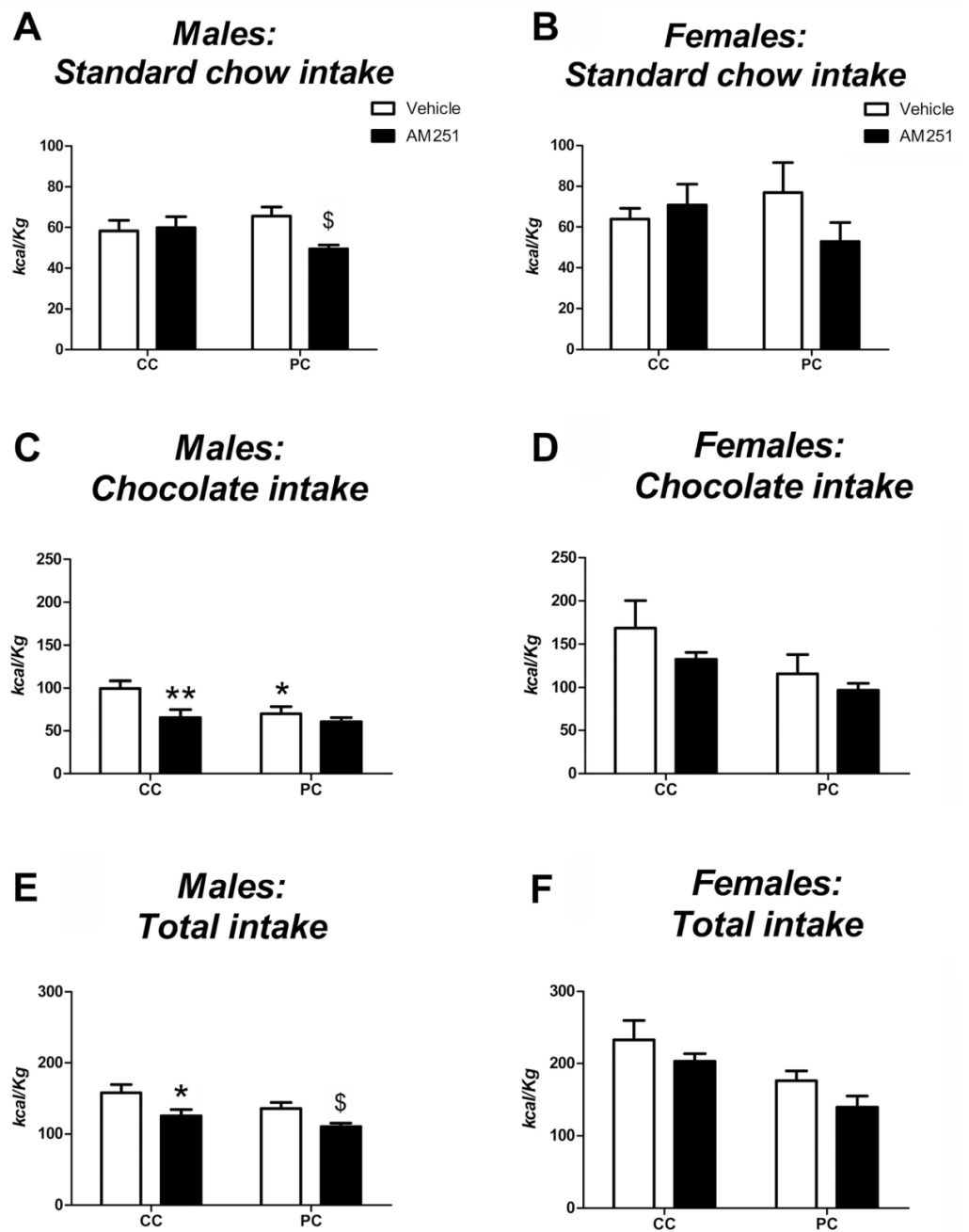
Regarding to caloric intake during adolescence (Fig 3B), a three-way ANOVA showed a main effect of time ( $F_{3,58} = 267.177, p < 0.001$ ), sex ( $F_{1,60} = 10.605, p < 0.01$ ), interaction between time and perinatal diet ( $F_{3,58} = 3.913, p < 0.05$ ) and interaction between time and sex ( $F_{3,58} = 27.710, p < 0.001$ ). No significant effect of perinatal diet was found. Specifically, Bonferroni multiple comparisons indicated that female offspring from the C group presented higher caloric intake relative to body weight than male offspring from C dams ( $F_{1,60} = 7.691, p < 0.01$ ). A similar tendency was noticed in P perinatal group ( $F_{1,60} = 3.163, p = 0.08$ ). It was found that the differences between the male and female offspring of control dams were significant on the first 2 days with free access to chocolate ( $p < 0.001$ ). In contrast, the differences between male and female PC were significant on days 1, 2 and 4 ( $p < 0.001$ ). Male offspring from P group displayed higher caloric intake than males from C group at day 4 of the test ( $p < 0.05$ ) (Fig 3B).

Concerning chocolate preference in adulthood (Fig 3C), we detected an effect of time ( $F_{3,61} = 587.130, p < 0.001$ ), perinatal diet ( $F_{1,63} = 18.156, p < 0.001$ ) and sex ( $F_{1,63} = 15.384, p < 0.001$ ). The interaction between time and perinatal diet, and the interaction between time and sex were also significant ( $F_{3,61} = 10.031, p < 0.001$  and  $F_{3,61} = 3.372, p < 0.05$ , respectively). Similar to the adolescent period, offspring from P perinatal group displayed lower chocolate preference than control offspring in both sexes ( $F_{1,63} = 5.296, p < 0.05$  and  $F_{1,63} = 14.311, p < 0.001$ , for male and female respectively). Furthermore, the increased preference for chocolate in female offspring was also demonstrated in adulthood in both perinatal groups ( $F_{1,63} = 10.492, p < 0.01$  and  $F_{1,63} = 5.129, p < 0.05$ , for control and free choice perinatal groups respectively). Additionally, differences between CC and PC groups were significant in male offspring on the days when chocolate was fully available ( $p < 0.05/0.01$ , for days 1 and 2 respectively). In contrast the difference between female CC and female PC was significant on days 1, 2 and 4 ( $p < 0.05/0.01/0.001$ ). Regarding sex differences, the Bonferroni test indicated significant differences from day 2 to 4 in the control perinatal group ( $p < 0.01/0.001$ ). In contrast, significant differences were found between male and female from P dams on days 2 and 4 ( $p < 0.01$ ) (Fig 3C).

In relation to the caloric intake during adulthood, a three-way repeated measures ANOVA indicated a main effect of time ( $F_{3,61} = 176.469, p < 0.001$ ), sex ( $F_{1,63} = 113.131, p < 0.001$ ) and a significant interaction between time and sex ( $F_{3,61} = 14.581, p < 0.001$ ). Specifically, female offspring presented higher caloric intake relative to body weight than male offspring in both perinatal groups ( $F_{1,63} = 56.683, p < 0.001$  and  $F_{1,63} = 56.756, p < 0.001$  for control and free choice perinatal groups respectively) (Fig 3D).

Taken together, these data indicate that in both periods of time (adolescence and adulthood) P offspring from both sexes displayed lower chocolate preference than control offspring during different days of the test. Additionally, females from both perinatal groups exhibited greater chocolate preference. Concerning caloric intake, female offspring presented higher caloric intake relative to body weight as well in both periods of time. However, there were no significant differences between the caloric intake of the perinatal groups throughout the test in both periods of time studied.

**AM251 test.** Regarding male offspring and standard chow intake (Fig 4A), a two-way ANOVA revealed no significant effect of both treatment and perinatal diet. However, the interaction between perinatal diet and treatment was almost significant ( $F_{1,26} = 4.006, p = 0.056$ ). Specifically, Bonferroni multiple comparisons showed that male offspring from the free choice perinatal group treated with AM251 displayed lower standard food intake than control



**Fig 4. AM251 test performed at adulthood.** A-F: Standard chow intake, chocolate intake and total intake (the sum of chocolate and standard chow intake) relative to body weight after 240 minutes of the beginning of the AM251 test in male (A,C,E) and female offspring (B,D,F). Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Open bars indicate vehicle treatment. Solid bars denote AM251 treatment. Two-way ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test: <sup>\*</sup>/<sup>\*\*</sup>  $p < 0.05/0.01$  vs CC vehicle group; <sup>§</sup>  $p < 0.05$  vs PC vehicle group.

doi:10.1371/journal.pone.0165432.g004



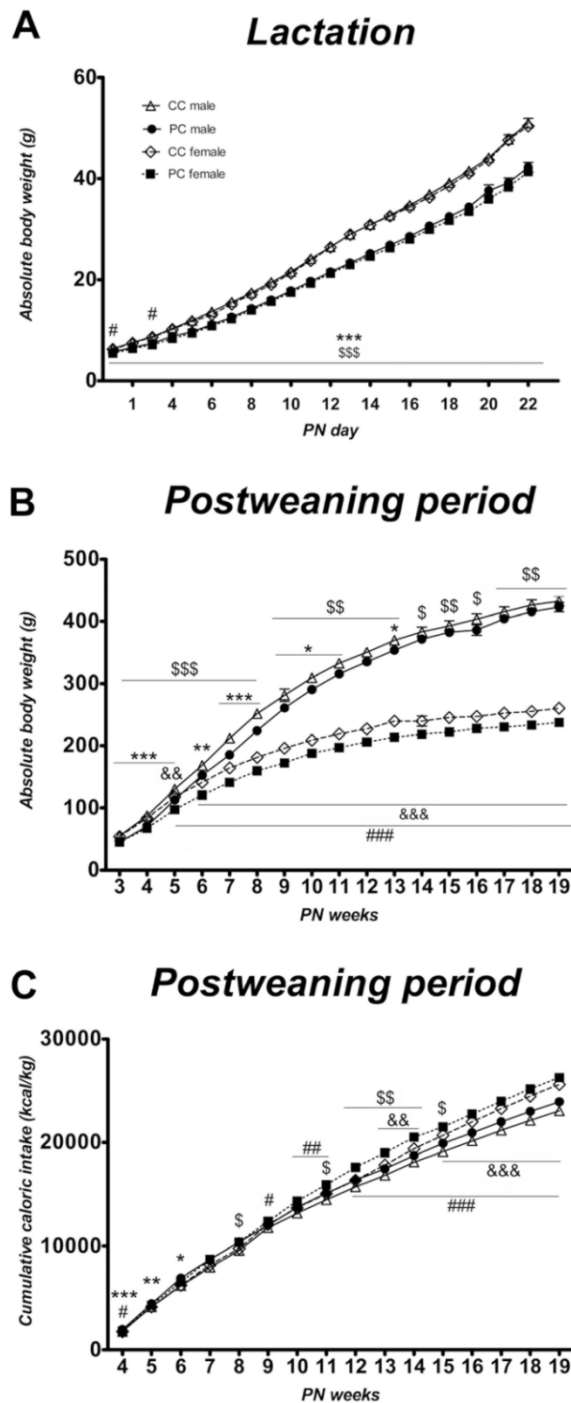
offspring ( $F_{1,26} = 6.698, p < 0.05$ ) (Fig 4A). Regarding chocolate intake (Fig 4C), a two-way ANOVA showed a significant main effect of perinatal diet and treatment. Particularly, control offspring exhibited greater cumulative chocolate intake than free choice offspring ( $F_{1,26} = 4.835, p < 0.05$ ). Additionally, animals who received AM251 displayed decreased chocolate intake than vehicle animals ( $F_{1,26} = 7.685, p < 0.05$ ). Although the interaction between perinatal diet and treatment was not significant, Bonferroni multiple comparisons revealed that male offspring from the control perinatal group treated with AM251 displayed lower intake than vehicle animals from the same perinatal group ( $F_{1,26} = 9.466, p < 0.01$ ), whereas no significant differences were found in free choice offspring. Additionally, free choice offspring who were administered the vehicle exhibited lower chocolate intake than control offspring with the same treatment ( $F_{1,26} = 6.689, p < 0.16$ ) (Fig 4C). Analyzing the variable total intake (Fig 4E), the two-way ANOVA indicated a main effect of treatment ( $F_{1,26} = 11.442, p < 0.01$ ) and perinatal diet ( $F_{1,26} = 4.761, p < 0.05$ ). Thus, PC animals exhibited lower intake than CC males. Additionally, Bonferroni multiple comparisons showed that animals injected with AM251 displayed lower total intake in both perinatal groups ( $F_{1,26} = 7.205, p < 0.05$  and  $F_{1,26} = 4.411, p < 0.05$  for control and free choice perinatal groups respectively) (Fig 4E).

Concerning female offspring and standard chow intake (Fig 4B), a two-way ANOVA did not show significant effects of either on treatment or perinatal diet. However, Bonferroni multiple comparisons indicated a tendency to a decreased standard chow intake in PC females treated with AM251 compared to vehicle ones ( $F_{1,24} = 3.447, p = 0.076$ ) (Fig 4B). Regarding chocolate intake (Fig 4D), a tendency effect of perinatal diet ( $F_{1,24} = 4.291, p < 0.058$ ) was observed. Thus, control female offspring exhibited higher chocolate intake than P female offspring. However, no significant effect of treatment was found (Fig 4D). Regarding the total intake (Fig 4F), ANOVA showed a main effect of treatment ( $F_{1,24} = 6.382, p < 0.05$ ) and perinatal diet ( $F_{1,24} = 7.407, p < 0.05$ ). Indeed, females injected with AM251 displayed a decreased total intake compared to vehicle females ( $F_{1,24} = 6.382, p < 0.05$ ), and PC females exhibited lower intake than CC females ( $F_{1,24} = 7.407, p < 0.05$ ). Additionally, the Bonferroni test indicated a higher tendency for PC females treated with AM251 to decrease total intake compared to vehicle ones ( $F_{1,24} = 4.276, p = 0.05$ ) (Fig 4F).

These results show that offspring treated with AM251 displayed a lower total food intake relative to body weight in both sexes. However, there were differences in the type of food consumed depending on the perinatal diet and sex. Thus, PC male offspring treated with AM251 displayed lower total food intake and standard food intake than vehicle ones, whereas CC males treated with AM251 presented lower total food intake and chocolate intake than vehicle ones. Regarding female offspring, PC females given AM251 showed a tendency to decrease total and standard food intake, similar to PC males. However, no differences were found when compared to CC females in the studied variables.

### Effect of maternal diet on body weight and caloric intake in offspring until adulthood

Offspring body weight evolution was assessed during the lactation and postweaning periods. From birth to PN day 22, a three-way repeated measures ANOVA showed an effect of time ( $F_{22,129} = 738.268, p < 0.001$ ), perinatal diet ( $F_{(1,150)} = 11750.56, p < 0.001$ ), and interaction between time and perinatal diet ( $F_{22,129} = 11.985, p < 0.001$ ). Male and female offspring from free choice dams displayed lower weight during the entire lactation period ( $F_{1,150} = 51.790, p < 0.001$  and  $F_{1,150} = 61.532, p < 0.001$ , respectively). Indeed, Bonferroni multiple comparisons showed significant differences between perinatal groups in both sexes from birth to PN day 22 (Fig 5A). Regarding the post-weaning period, a three-way repeated measures ANOVA showed



**Fig 5. Effect of perinatal diet on body weight and caloric intake of offspring.** Absolute body weight (g) of control offspring and free choice offspring from both sexes during lactation (A) and postweaning period (B). Cumulative caloric intake (kcal/kg) of control offspring and free choice offspring from both sexes during postweaning period (C). Control male offspring are represented as open triangles, control female as open rhombuses, free choice male offspring are represented as solid circles and free choice female offspring as

solid squares. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Three-way repeated measures ANOVA (time, sex and perinatal diet as factors) and Bonferroni *post-hoc* test:  $^{*/*/*/*}$   $p < 0.05/0.01/0.001$  to compare CC vs PC males;  $^{§/§/§/§/§}$   $p < 0.05/0.01/0.001$  to compare CC vs PC females;  $^{&&/&&&&}$   $p < 0.05/0.01/0.001$  to compare CC males vs females;  $^{###/###}$   $p < 0.05/0.01/0.001$  to compare PC males vs females.

doi:10.1371/journal.pone.0165432.g005

an effect of time ( $F_{16,50} = 888.939, p < 0.001$ ), perinatal diet ( $F_{1,65} = 18.290, p < 0.001$ ) and sex ( $F_{1,65} = 538.791, p < 0.001$ ). The interaction between time, sex and perinatal diet was also significant ( $F_{16,50} = 3.101, p < 0.01$ ). Specifically, the Bonferroni test showed that male offspring from P dams was leaner than control male offspring until the end of adolescence/beginning of adulthood (11–13<sup>th</sup> PN weeks). In contrast, female offspring from P dams presented lower weight during all stages. Additionally, sexual differences in body weight started to be significant at the 5<sup>th</sup> postnatal week in both perinatal groups (Fig 5B).

Concerning caloric intake relative to body weight, we found a significant effect of time ( $F_{15,975} = 15,11731, p < 0.001$ ), perinatal diet ( $F_{1,65} = 4.821, p < 0.05$ ), sex ( $F_{1,65} = 32.42,3, p < 0.001$ ) and a significant interaction between time, perinatal diet and sex ( $F_{15,975} = 2.321, p < 0.01$ ). Bonferroni multiple comparisons indicated that male offspring from free choice dams exhibited hyperphagia during the first weeks of infant period when they were compared to control male offspring ( $^{*/*/*}$   $p < 0.05/0.01/0.001$ ). Moreover, female offspring from P dams displayed hyperphagia at the 8<sup>th</sup> week and from the 11 to 15<sup>th</sup> week of adolescence ( $^{§/§/§}$   $p < 0.05/0.01$ ). Additionally, female offspring displayed higher caloric intake relative to body weight than male offspring in both perinatal groups (Fig 5C).

Together these results indicate that offspring from free choice perinatal group exhibited lower weight and hyperphagia than their controls in different stages of development. Furthermore, data denotes that these effects depend on the sex. Thus, male offspring displayed these findings during infant period and adolescence whereas female offspring kept a lower weight during all stages and showed hyperphagia in adolescence up to the 15<sup>th</sup> PN week.

### Effect of maternal diet on leptinemia, plasmatic metabolites and adiposity of offspring at adulthood

A two-way ANOVA showed an effect of sex on the plasma levels of leptin, glucose, HDL, AST and AST/ALT ratio (Table 1). We also detected an effect of perinatal diet on the plasma levels of triglycerides, HDL, LDL, VLDL and bilirubin. An interaction between factors was only found in the plasma levels of leptin. Bonferroni multiple comparisons demonstrated that PC males exhibited higher levels of leptin, LDL and bilirubin, but lower levels of HDL, than CC males ( $^{*/*/*}$   $p < 0.05/0.01$ ). Equally, we observed higher levels of LDL, but lower levels of HDL in PC females compared to CC females ( $^{§/§/§}$   $p < 0.05/0.01$ ). Additionally, PC females displayed lower levels of leptin, glucose, total cholesterol, and AST/ALT ratio than PC males ( $^{###/###}$   $p < 0.05/0.001$ ) (Table 1).

Concerning adiposity (Table 2), we found an effect of sex on perirenal, perigonadal and abdominal fat, and perirenal and perigonadal fat percentage relative to body weight. An effect of perinatal diet on perirenal, perigonadal and abdominal fat, as well as their respective percentage relative to body weight was found. Interaction between sex and perinatal diet was specifically observed in perirenal fat weight and the percentage of perirenal fat relative to body weight. Particularly, PC males exhibited an increase in perirenal and abdominal fat weights as well as their respective percentages relative to body weight compared to CC males ( $^{*/*/*/*}$   $p < 0.01/0.001$ ). PC females only showed an increase in perigonadal fat percentage with respect to CC females ( $^{§}$   $p < 0.05$ ). Moreover, CC and PC females exhibited a decrease in the perirenal,

Table 1. Plasma leptin, metabolites and hepatic transaminases at 5<sup>th</sup> postnatal month<sup>a</sup>.

	Male		Female		Two-way ANOVA		
	CC (n = 6)	PC (n = 5)	CC (n = 5)	PC (n = 5)	Interaction	Perinatal diet	Sex
Leptin (µg/mL)	5.829±0.88	<b>11.21 ±1.69*</b>	6.07±2.17	<b>4.15±0.89<sup>#</sup></b>	$F_{1,16} = 6.817, p = 0.0189$	NS	$F_{1,16} = 5.94, p = 0.0269$
Glucose (mg/dL)	187.33 ±12.11	211.40 ±17.04	169.60 ±15.65	<b>154.80 ±15.57<sup>#</sup></b>	NS	NS	$F_{1,17} = 7.60, p = 0.013$
Triglycerides (mg/dL)	79.50±3.12	105.40±9.84	82.60±15.96	110.40 ±10.87	NS	$F_{1,17} = 8.241, p = 0.011$	NS
tCholesterol (mg/dL)	39.00±5.49	38.60±2.61	37.20±2.53	<b>26.40±4.04<sup>#</sup></b>	NS	NS	NS
HDL (mg/dL)	26.67±3.04	<b>13.80±7.73*</b>	21.60±2.91	<b>2.20±0.82<sup>S</sup></b>	NS	$F_{1,17} = 17.304, p = 0.001$	$F_{1,17} = 4.617, p = 0.046$
LDL (mg/dL)	12.37±2.79	<b>37.36 ±11.80*</b>	17.01±8.4	<b>40.29±4.76<sup>S</sup></b>	NS	$F_{1,17} = 13.144, p = 0.002$	NS
VLDL (mg/dL)	15.90±0.62	21.08±1.97	16.52±3.19	22.08±2.17	NS	$F_{1,17} = 8.241, p = 0.011$	NS
Urea (mg/dL)	27.50±2.89	26.80±1.29	30.40±2.02	28.80±4.33	NS	NS	NS
Bilirubin (mg/dL)	0.13±0.02	<b>0.50±0.19**</b>	0.20±0.05	0.24±0.06	NS	$F_{1,17} = 5.512, p = 0.031$	NS
ALKP (UI)	73.83±4.57	64.60±2.66	63.20±7.79	68.40±2.08	NS	NS	NS
γGT (UI)	10.50±1.01	8.80±1.78	12.20±0.96	11.40±0.57	NS	NS	NS
AST (UI)	162.50 ±33.02	108.80 ±18.26	145.00 ±20.39	172.60 ±27.22	NS	NS	$F_{1,17} = 5.152, p = 0.037$
ALT (UI)	55.00±3.96	59.80±6.26	70.40±8.37	74.60±10.56	NS	NS	NS
AST/ALT	0.39±0.06	0.57±0.38	<b>4.05 ±0.24***</b>	<b>3.97±0.42<sup>###</sup></b>	NS	NS	$F_{1,17} = 290.791, p < 0.001$

<sup>a</sup>Values are expressed as means ± S.E.M. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA with perinatal diet and sex as factors.

CC: offspring from control-fed dams. PC: offspring from highly palatable diet-fed dams. NS: non significant.

Bonferroni test: \*/\*\*/\*\*\*  $p < 0.05/0.01/0.001$  vs CC males;

<sup>S/S</sup>  $p < 0.05/0.01$  vs CC females;

<sup>###</sup>  $p < 0.05/0.001$  vs PC males.

doi:10.1371/journal.pone.0165432.t001

perigonadal and abdominal fat weights compared to the respective CC (\*\*/\*\*\*  $p < 0.01/0.001$ ) and PC (<sup>###</sup>  $p < 0.01/0.001$ ) males (Table 2).

In summary, these data indicate that animals perinatally exposed to a highly palatable diet presented alterations in plasmatic metabolites and adiposity. Particularly, PC male offspring displayed higher leptinemia, decreased levels of plasma HDL, increased levels of plasma LDL, greater bilirubin, increased perirenal fat and abdominal adiposity than CC male offspring. In contrast, PC female offspring displayed decreased levels of plasma HDL and increased levels of plasma LDL and perigonadal adiposity when they were compared to CC females. In addition, sexual dimorphism was found in the leptinemia, glycemia, HDL, the AST/ALT ratio and adiposity.

### Effect of maternal diet on endocannabinoid metabolism gene expression on the hypothalamus, liver and PAT of offspring at adulthood

Gene expression levels of several ECS components (*Cnr1*, *Cnr2*, *Napepld*, *Faah*, *Dagla*, *Daglb*, *Mgl1*) were evaluated in male and female offspring from rat dams fed either a standard chow (CC) or a high caloric diet (PC) in the hypothalamus, liver and perirenal adipose tissue (PAT).

Table 2. Adiposity at 5<sup>th</sup> postnatal month<sup>a</sup>.

	Male		Female		Two-way ANOVA		
	CC (n = 12)	PC (n = 10)	CC (n = 11)	PC (n = 11)	Interaction	Perinatal diet	Sex
Perirenal fat (g)	8.90±0.41	12.04±0.65***	4.82±0.36***	4.92±0.43###	$F_{1,40} = 10.661$ $p = 0.002$	$F_{1,40} = 12.309$ $p = 0.001$	$F_{1,40} = 144.049$ $p < 0.001$
Perirenal fat/BW (%)	1.97±0.08	2.42±0.26***	1.80±0.12	1.94±0.15###	$F_{1,40} = 5.170$ , $p = 0.028$	$F_{1,40} = 11.497$ $p = 0.002$	$F_{1,40} = 13.570$ , $p = 0.001$
Perigonadal fat (g)	9.32±0.61	11.20±1.15	6.14±0.67**	7.53±0.51##	NS	$F_{1,40} = 4.730$ , $p = 0.036$	$F_{1,40} = 20.894$ , $p < 0.001$
Perigonadal fat/BW (%)	2.06±0.12	2.25±0.30	2.29±0.21	2.97±0.16 <sup>§</sup>	NS	$F_{1,40} = 8.466$ , $p = 0.006$	$F_{1,40} = 4.025$ , $p = 0.052$
Abdominal fat (g)	18.22±0.94	23.23±1.69**	10.96±0.96***	12.44±0.87###	NS	$F_{1,40} = 8.318$ , $p = 0.006$	$F_{1,40} = 64.228$ , $p < 0.001$
Abdominal fat/BW (%)	4.03±0.18	5.11±0.33**	4.15±0.28	4.90±0.29	NS	$F_{1,40} = 11.599$ $p = 0.002$	NS

<sup>a</sup>Values are expressed as means ± S.E.M. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA with perinatal diet and sex as factors.

CC: offspring from control-fed dams. PC: offspring from highly palatable diet-fed dams. NS: non significant.

Bonferroni test: \*\*/\*\*\* $p < 0.01/0.001$  vs CC males;

<sup>§</sup> $p < 0.05$  vs CC females;

###/### $p < 0.01/0.001$  vs PC males.

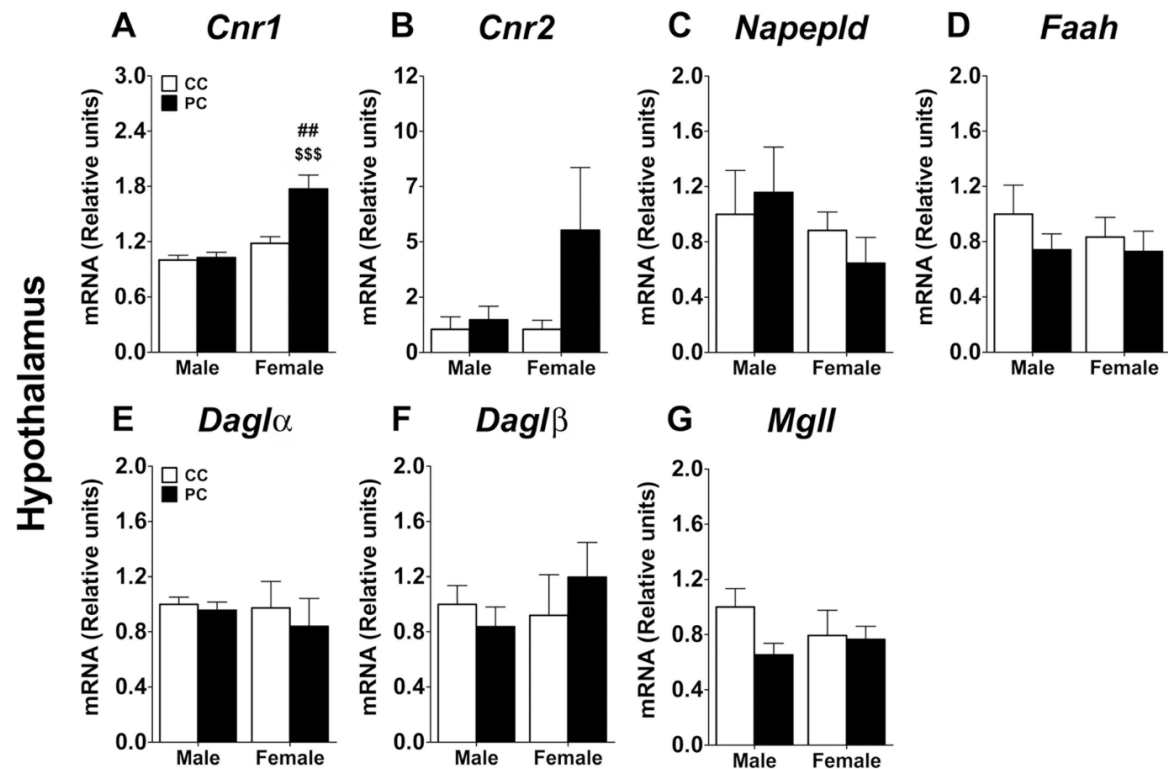
doi:10.1371/journal.pone.0165432.t002

We decided to evaluate the endocannabinoid metabolism gene expression in PAT based on the prominent adiposity observed in PC male offspring.

Regarding hypothalamus, a two-way ANOVA indicated an effect of perinatal diet ( $F_{1,17} = 27.32$ ,  $p < 0.0001$ ) and sex ( $F_{1,17} = 10.01$ ,  $p < 0.01$ ), and an interaction between factors ( $F_{1,17} = 12.09$ ,  $p < 0.01$ ) in the gene expression of *Cnr1* (Fig 6A). No effect or interaction was observed on the gene expression of the remaining ECS components (Fig 6B–6G). Regarding the Bonferroni analysis, PC female offspring showed an increase in the gene expression of *Cnr1* in the hypothalamus when they were compared to PC males and CC females respectively ( $^{##/§§§} p < 0.01/0.001$ ).

Concerning the liver, a two-way ANOVA did not show any effect or interaction on the gene expression of *Cnr1* and *Daglα* (Fig 7A and 7E). However, we detected a sex effect on the gene expression of *Cnr2* ( $F_{1,17} = 7.15$ ,  $p = 0.016$ ), *Napepld* ( $F_{1,16} = 4.65$ ,  $p = 0.0465$ ) and *Mgll* ( $F_{1,17} = 8.55$ ,  $p = 0.009$ ) (Fig 7B, 7C and 7G). A perinatal diet effect on the expression of *Napepld* ( $F_{1,16} = 5.16$ ,  $p = 0.0372$ ), *Faah* ( $F_{1,17} = 5.19$ ,  $p = 0.036$ ), *Daglβ* ( $F_{1,16} = 5.93$ ,  $p < 0.05$ ) and *Mgll* ( $F_{1,17} = 10.73$ ,  $p < 0.001$ ) was also found (Fig 7C, 7D, 7F and 7G). Interaction between factors was only detected in the gene expression of *Mgll* ( $F_{1,17} = 9.62$ ,  $p = 0.0065$ ) (Fig 7G). Specifically, Bonferroni multiple comparisons showed that PC female offspring exhibited a decrease in the mRNA levels of *Faah* and *Mgll* when they were compared to CC females ( $^{§/§§} p < 0.05/0.01$ ) (Fig 7D and 7G). *Mgll* gene expression was increased in CC female offspring when they were compared to CC males (\*\*  $p < 0.01$ ) (Fig 7G).

In relation to PAT, a two-way ANOVA indicated an effect of perinatal diet ( $F_{1,16} = 13.8$ ,  $p = 0.0018$ ) and sex ( $F_{1,16} = 20.73$ ,  $p = 0.003$ ), and an interaction between factors ( $F_{1,16} = 27.08$ ,  $p < 0.0001$ ) on the gene expression of *Cnr1*. Particularly, a Bonferroni analysis indicated that PC female offspring showed an increase in the gene expression of *Cnr1* when they were compared to CC females and PC males ( $^{§§/###} p < 0.001$ ) (Fig 8A). A sex effect was also detected on the gene expression of *Cnr2* ( $F_{1,16} = 9.99$ ,  $p = 0.0061$ ). The Bonferroni test indicated that PC females had an increased gene expression of *Cnr2* when they were compared to PC males

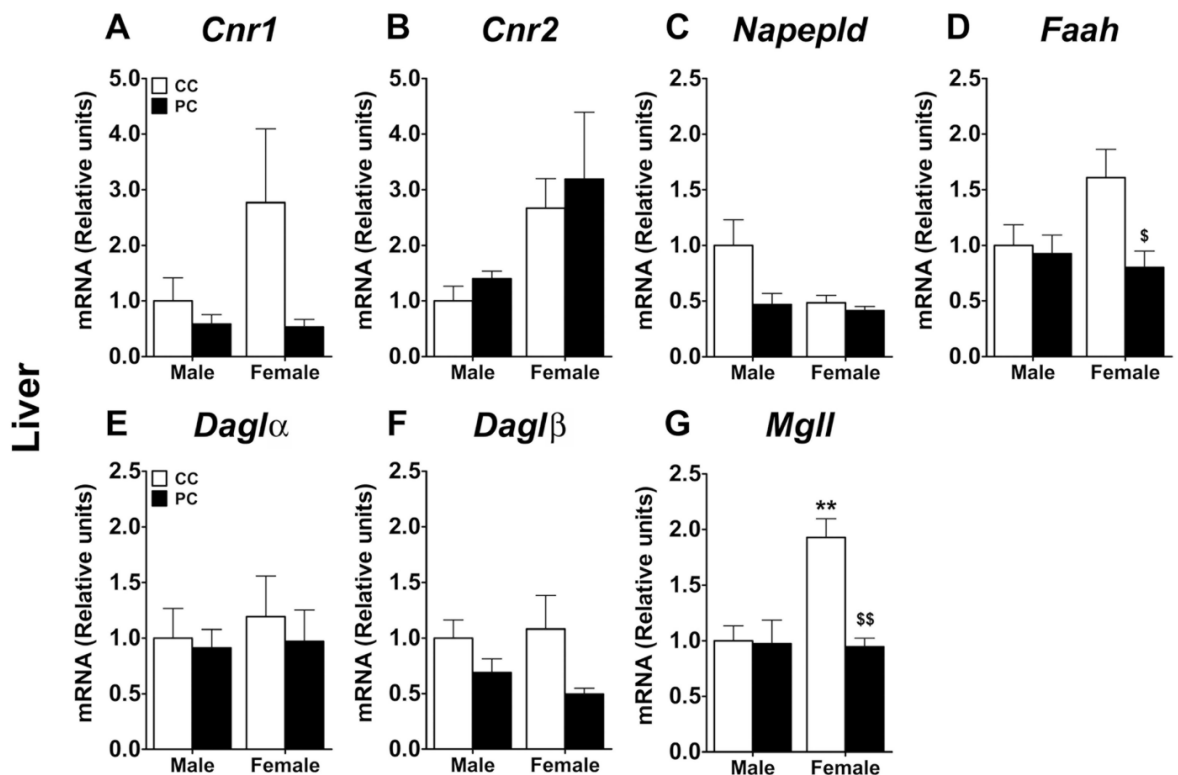


**Fig 6. Levels of endocannabinoid metabolism gene expression in the hypothalamus.** A.-*Cnr1*, cannabinoid CB1 receptor; B.-*Cnr2*, cannabinoid CB2 receptor; C.-*Napepld*, N-acyl phosphatidylethanolamide-dependent phospholipase D; D.-*Faah*, fatty acid amidohydrolase; E.-*Daglα*, diacyl-glycerol lipase alpha; F.- *Daglβ*, diacyl-glycerol lipase beta; G.-*MglI*, monoacyl-glycerol lipase. Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Two-way ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test: #  $p < 0.01$  vs PC male group; \$\$\$  $p < 0.001$  vs CC female group.

doi:10.1371/journal.pone.0165432.g006

(\*  $p < 0.05$ ) (Fig 8B). Regarding *Faah*, we detected an effect of perinatal diet ( $F_{1,16} = 9.23$ ,  $p = 0.0078$ ) and sex ( $F_{1,16} = 14.21$ ,  $p = 0.0017$ ), and an interaction between factors ( $F_{1,16} = 6.89$ ,  $p = 0.0184$ ). PC male and CC female offspring showed decreased gene expression of *Faah* compared to CC males (\*\*  $p < 0.01$ ) (Fig 8D). Concerning *Daglα*, a two-way ANOVA indicated a main effect of perinatal diet ( $F_{1,16} = 4.95$ ,  $p = 0.040$ ) and a significant interaction between factors ( $F_{1,16} = 5.195$ ,  $p = 0.037$ ). A *post-hoc* test indicated that CC females had a decreased gene expression of *Daglα* compared to CC males (Fig 8E). Similarly, an interaction between sex and perinatal diet was found in *Daglβ* gene expression ( $F_{1,15} = 15.84$ ,  $p = 0.0012$ ). Thus, PC male offspring and CC female offspring presented a decreased gene expression of *Daglβ* when they were compared to CC male offspring (\*  $p < 0.05$ ) (Fig 8F). No effects and interaction were found in the gene expression of *Napepld* and *MglI* (Fig 8C and 8G).

Taken together, these results indicate that animals exposed to a highly palatable food during the perinatal period presented modifications in some components of the ECS gene expression later in life, even though they were maintained with a standard chow diet after weaning. These alterations include modifications in the hypothalamus, liver and PAT. Specifically, it has been shown that P offspring exhibited modifications in *Cnr1* gene expression of hypothalamus and PAT, alterations in the expression of *Napepld*, *Daglβ* and *MglI* in the liver and decreased levels of *Faah* in the liver and PAT. However, sexual differences were found in these findings. Thus,



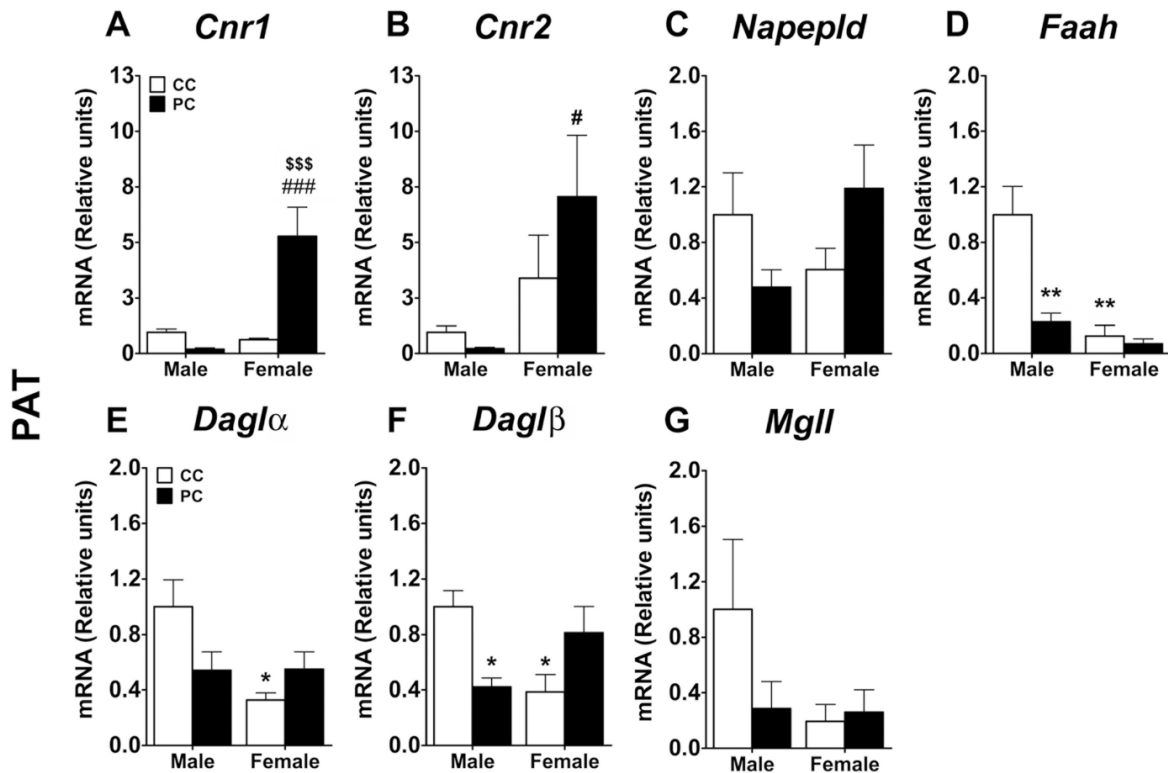
**Fig 7. Levels of endocannabinoid metabolism gene expression in liver.** Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Two-way ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test: \*\*  $p < 0.01$  vs CC male group;  $^{\$/\$}$   $p < 0.05/0.01$  vs CC female group. For abbreviations see legend to Fig 6 or S2 Table.

doi:10.1371/journal.pone.0165432.g007

PC females showed an increased expression of *Cnr1* gene expression in the hypothalamus and PAT and reduced expression of *Mgll* in the liver when they were compared to CC females and/or PC males. In contrast, PC males exhibited significantly reduced levels in the gene expression of *Faah* and *Daglβ* in PAT when they were compared to CC males. Additionally, female offspring had an increased expression of *Cnr2* in the liver and PAT, that was significantly different from the *Cnr2* expression of PC males in PAT.

### Effect of maternal diet on fatty acid metabolism and *Ppars* gene expression on the liver and PAT of offspring at adulthood

The gene expression of selected key metabolic enzymes regulating lipogenesis (*Acaca/Scd1*) and  $\beta$ -oxidation (*Cpt1a*, *Cpt1b*) in the liver and PAT was evaluated in the offspring of rats fed with either a high caloric or a standard chow diet (Fig 9). Regarding the liver, we only detected a main effect of sex on the gene expression of *Cpt1a* ( $F_{1,17} = 35.48$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig 9C). In PAT, we observed an effect of perinatal diet ( $F_{1,16} = 5.536$ ,  $p = 0.03$ ) and sex ( $F_{1,16} = 10.3$ ,  $p < 0.01$ ), and a significant interaction between factors ( $F_{1,16} = 7.341$ ,  $p = 0.0155$ ) in the gene expression of *Acaca*. Regarding the Bonferroni analysis, PC male offspring showed an increase in the gene expression of *Acaca* in PAT when they were compared to CC males and PC females (\*\*/#  $p < 0.01$ ) (Fig 9D). A two-way ANOVA detected a sex effect on the gene expression of *Cpt1b* in PAT ( $F_{1,16} = 35.48$ ,  $p < 0.0001$ ). Thus, females from both perinatal groups



**Fig 8. Levels of endocannabinoid metabolism gene expression in perirenal adipose tissue (PAT).** Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Two-way ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test: \*/\*\*  $p < 0.05/0.01$  vs CC male group; ###/###  $p < 0.05/0.001$  vs PC male group; \$\$\$  $p < 0.001$  vs CC female group. For abbreviations see legend to Fig 6 or S2 Table.

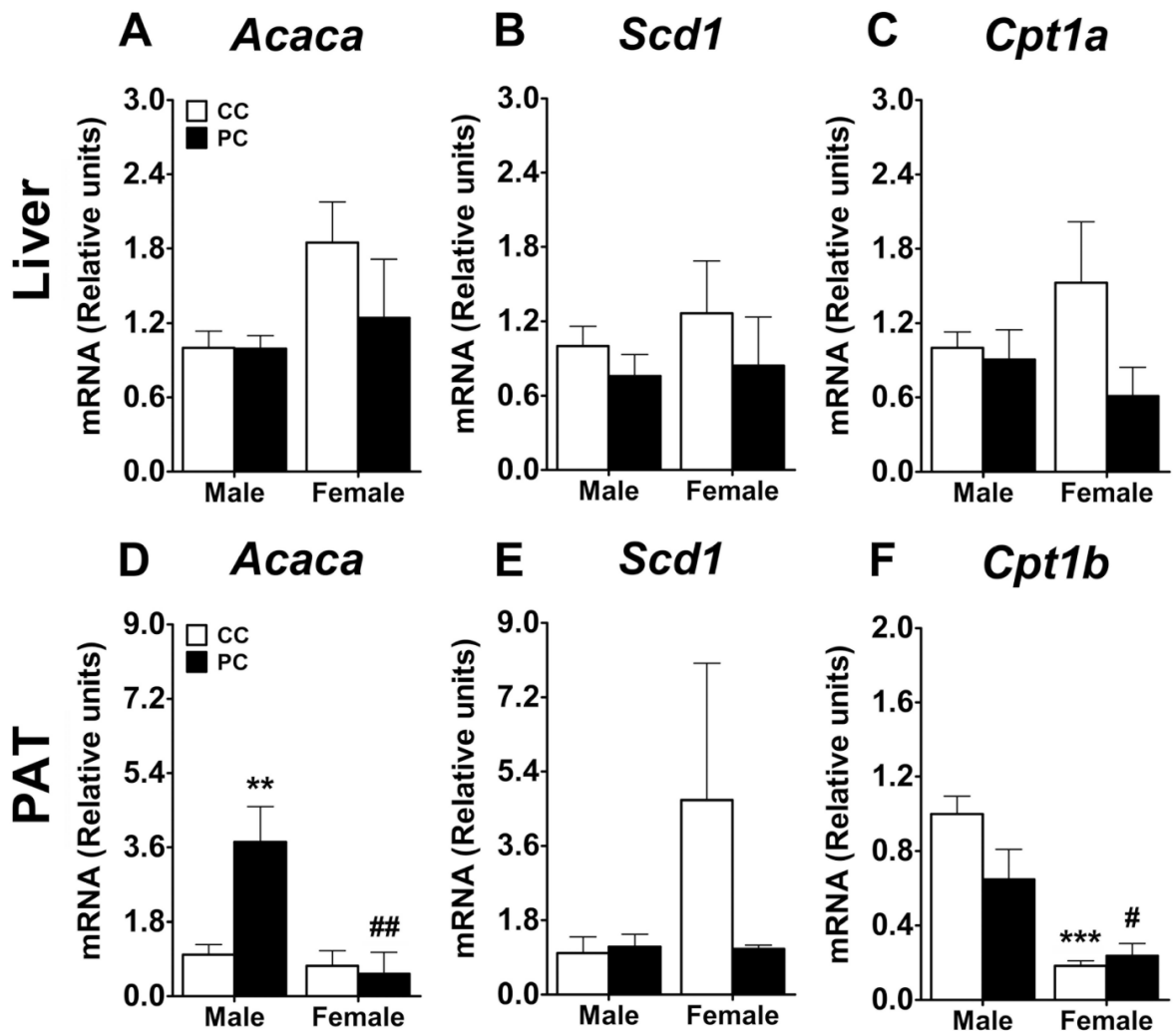
doi:10.1371/journal.pone.0165432.g008

(CC and PC) presented a decrease in the gene expression of *Cpt1b* compared to the respective CC and PC males ( $^{\#}/*** p < 0.05/0.001$ ) (Fig 9F). Interestingly, no effects on *Scd1* gene expression were found in the liver and PAT (Fig 9B and 9E).

Additionally, the gene expression of *Ppara* and *Pparγ* was also analyzed in the liver and PAT (Fig 10). We found a sex effect ( $F_{1,17} = 4.51, p = 0.0487$ ) and a significant interaction between factors ( $F_{1,17} = 4.53, p = 0.0048$ ) in the gene expression of *Ppara* in the liver. Specifically, the Bonferroni analysis indicated that CC females presented an increased gene expression of *Ppara* when they were compared to CC males ( $* p < 0.05$ ) (Fig 10A). Concerning *Pparγ* in the liver, a two-way ANOVA detected a perinatal diet effect ( $F_{1,16} = 14.58, p = 0.0015$ ) and a sex effect ( $F_{1,17} = 4.51, p = 0.048$ ). Thus, PC male and PC female offspring exhibited a reduced gene expression of *Pparγ* compared to CC males and PC females respectively ( $^{\#}/\$ p < 0.05/0.05$ ) (Fig 10B). Regarding PAT, we detected a sex effect on the gene expression of *Ppara* ( $F_{1,15} = 6.74, p = 0.0203$ ) (Fig 10C). Thus, female offspring displayed decreased gene expression compared to male offspring. Concerning *Pparγ*, a two-way ANOVA indicated a main effect of perinatal diet ( $F_{1,16} = 4.9, p = 0.040$ ) and a sex effect  $F_{1,16} = 14.3, p = 0.0016$ ). CC female offspring showed a reduced gene expression of *Pparγ* in PAT compared to CC males ( $** p < 0.01$ ) (Fig 10D).

In conclusion, these data indicate that maternal exposure to a highly palatable food alters the gene expression of the lipogenic enzyme *Acaca* in PAT of male offspring. Moreover, sexual





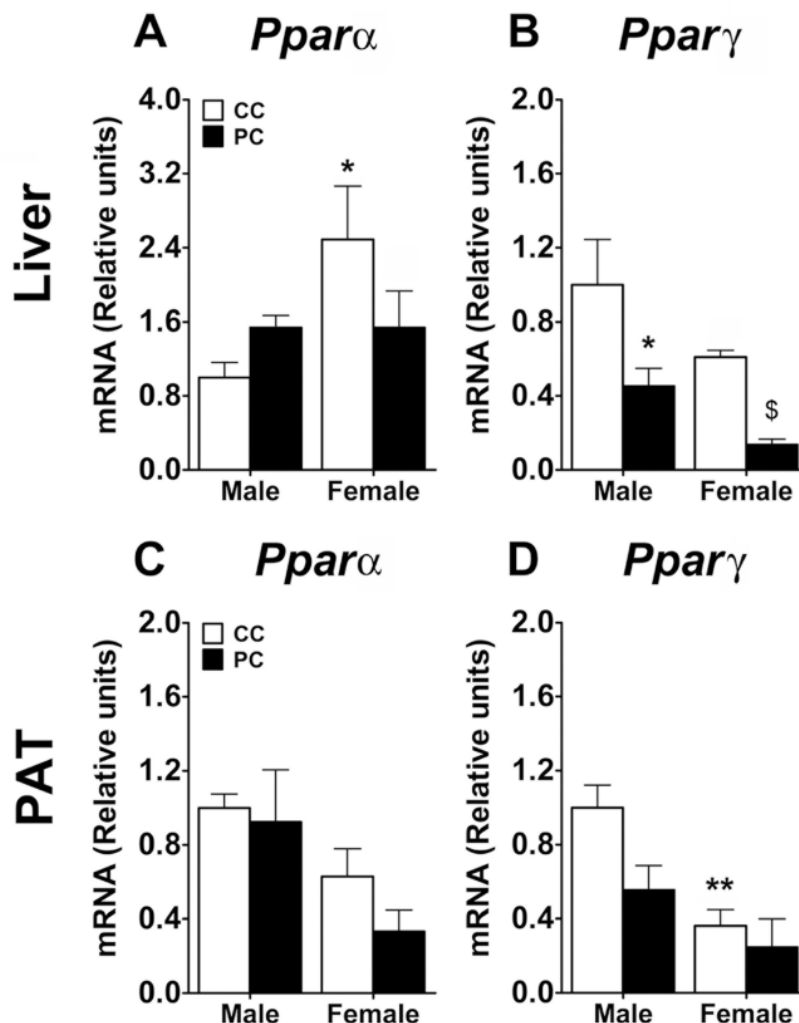
**Fig 9. Levels of fatty acid metabolism gene expression in liver (A-C) and PAT (D-F).** *Acaca*, acetylcoenzyme A carboxilase; *Scd1*, stearylcozyme A desaturase 1; *Cpt1a/b*, carnitine palmitoyltransferase 1 liver/muscle isoforms. Values are expressed as means  $\pm$  S.E. M. Two-way ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test: \*\*/\*\*\*  $p < 0.01/0.001$  vs CC male group, #/##  $p < 0.05/0.01$  vs PC male group.

doi:10.1371/journal.pone.0165432.g009

differences were found in this finding. PC males exhibited higher expression of *Acaca* than PC females. Additionally, sexual dimorphism was found in the gene expression of *Cpt1b* in PAT. Thus, CC females and PC females exhibited a decreased expression of this fatty acid  $\beta$ -oxidation enzyme when they were compared to CC males and PC males respectively. Furthermore, the offspring exposed to this diet during the perinatal period showed reduced gene expression of *Ppar $\gamma$* , especially in the liver but also in PAT.

## Discussion

We have reported here the long-term consequences of the exposure to an inadequate maternal diet during the perinatal period. For the first time, we evaluated the gene expression of the



**Fig 10.** Levels of *Ppara* $\alpha$  and *Ppar* $\gamma$  gene expression in liver (A,B) and PAT (C,D). Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test: \*/\*\*  $p < 0.05/0.01$  vs CC male group.

doi:10.1371/journal.pone.0165432.g010

most important receptors and enzymes of the endocannabinoid system after perinatal exposure to adverse nutritional conditions and the response to the CB1 blockade of feeding behavior. Furthermore, the expression of genes related to ECS, fatty acid metabolism and PPARs were also evaluated. The results strongly indicate that maternal exposure to a highly palatable food is associated to long-term alterations in the offspring of both sexes, even though these animals were weaned on standard chow diet. Specifically, we have found: a) Modifications in food preferences and in the behavioral response to a cannabinoid inverse agonist; b) Alterations in growing parameters, caloric intake, plasma metabolites and adiposity; c) Modifications on the profile of gene expression of ECS components and other metabolism-related genes; d) Sex-specific alterations. We discuss them below.

## Maternal highly palatable diet alters food choices in offspring from both sexes and modifies the response to the CB1 receptor blockade

Human and animal research has suggested that food preferences could be programmed during pregnancy and/or the lactation period [15,16,49,50]. Accordingly, we found changes in food preferences of male and female offspring from free choice dams. They preferred chocolate less during the compulsive feeding test than the control offspring, and this finding was consistent in both life periods studied (adolescence and adulthood). This decreased chocolate preference in offspring from free choice dams could indicate hypofunction in the central reward system. This state has been previously reported in animal models of chronic consumption of high fat diet from weaning and it has been associated to reduced sucrose preference [51]. However, a considerable amount of studies have reported that either maternal consumption of junk food or maternal high fat feeding increase the preference for highly palatable foods in offspring later in life, within the perinatal period [15,16,18]. In these studies, mothers preferred junk food over standard chow diet during the pregnancy and lactation [15], or mothers did not have choice and then they consumed a great amount of fat and/or sugars [16,18]. In contrast, in our study, mothers were exposed to a highly palatable diet throughout the perinatal period, including pregnancy and lactation. Curiously, we noticed that they preferred chocolate less during these periods than in pregestation. Therefore, these data suggest that the programming of food preferences during the perinatal period might depend on the volume of the inadequate diet ingested by the mother or by the mother's preference for specific foods during the gestation and lactation periods.

The surprising modifications in food preferences of rat dams could be explained in part because these animals were exposed to a free choice between a standard chow and a highly palatable diet during a long time (eight weeks prior to mating). The palatable diet used in this experiment is hypoproteic (S1 Table). Hence, the high intake of palatable diet might not provide the protein needed during pregnancy and lactation. Consequently, rat dams could have adapted their food intake and didn't prefer the chocolate mixture during these critical periods, so they could increase their protein intake. This hypothesis is supported by the results of previous experiments. Thus, it has been shown that malnourished rats could modify their food preferences according to their nutrient deficiency [52]. Additionally, it has been reported that craving during pregnancy may be associated to the nutritional requirements during this specific period of life [53,54].

Regarding the underlying mechanism of the food preference modifications in offspring, alterations in the opioid and dopaminergic signaling have been documented within the central reward system [16,18]. The endocannabinoid system could also play an important role in this behavior. Indeed, it keeps an important relation to the opioid and dopaminergic systems, [21,55] and it has been implicated in the intake of palatable foods [56] and/or in the perception of sweet taste [28]. In our study, we evaluated the behavioral response after an acute dose of AM251, a CB1 receptor inverse agonist. Specifically, we assessed the differential effect of AM251 on the caloric intake of both types of food (standard chow and a highly palatable diet) in the offspring from both perinatal diets. Interestingly, we noticed that animals exposed to a highly palatable diet prenatally, particularly male offspring, presented a different response. Thus, AM251 was able to decrease standard intake but not chocolate intake in male offspring from free choice dams. In contrast, AM251 decreased chocolate intake in control male offspring but not standard chow intake. Similar responses were previously reported [57]. Here, the CB1 antagonist Rimonabant decreased only standard chow intake during the withdrawal phase of an animal model of palatable diet alternation whereas any effect was found on palatable food intake during the palatable diet phase. Additionally, our data support the hypothesis

that AM251 effectiveness could depend on the perception of palatability that in our study was evaluated through chocolate preference. In fact, AM251 could decrease the motivation to obtain highly palatable food when a free choice between two types of food is available [29,30,58]. According to this, male offspring from P dams in our study could perceive standard chow as more palatable, and therefore AM251 decreased more the intake of this type of food. On the other hand, female offspring exhibited a lower effect of AM251, despite the fact that they presented greater chocolate preference than males. Here, we noticed a greater tendency in female offspring from P mothers to have lower standard chow intake compared to P male offspring. However, we did not find any differences when compared to control female offspring. It is possible that a low cannabinoid activity, as a consequence of low eCB levels in the hypothalamus [36], could mask the anorexigenic effect of AM251 on chocolate preference in PC offspring. On the other hand, the estrous cycle could also influence the results due to the fact that estradiol and progesterone play an important role in food intake [59]. Moreover, it has been described as a modification in the expression of metabolism-related genes and alterations in the density and affinity of CB1 receptors according to the estrous stage [60,61]. Hence, the alterations in the receptors involved in the response of AM251 could therefore affect its effectiveness.

The differential response in AM251 and the perception of palatability could also depend on cannabinoid receptor distribution in the central reward system as we suggest above. Accordingly, previous studies have reported modifications in the gene expression of *Cnr1* after the continuous and long-term access to a highly palatable food. Then, CB1 down-regulation has been reported in the cingulate cortex, specific hypothalamic areas, hippocampus, cortex, nucleus accumbens and entopeduncular nucleus [62,63]. Additionally, lower reward sensitivity has been linked to alterations in the gene expression of *Cnr1* and *Faah* in the hippocampus together with a decreased effect of the CB1 antagonism on reducing the intake of palatable food [64]. Therefore, these data suggest that the perinatal exposure to an inadequate diet might have modified the expression of genes involved in reward permanently. Thus, offspring from palatable dams with decreased reward sensitivity and differential response to CB1 blockade could present alterations in the expression of components of ECS in the reward system, even though they were only exposed to highly palatable food perinatally.

### Maternal highly palatable food alters caloric intake, growth and metabolic parameters on offspring

In our study we observed important differences in body weight and caloric intake throughout the periods of development studied in a diet and sex-dependent manner. Thus, the P offspring were underweight at birth and were leaner in several stages of life. It is striking to note that despite the fact that the offspring were exposed to a hypercaloric diet, they were born underweight. Taking into account the low protein content of the highly palatable food used in this experiment (S1 Table), these data suggest that P offspring were exposed to a protein restriction during the perinatal period including lactation, as previously discussed in animal models exposed to cafeteria diet or junk food during these critical periods [15,16,36].

Interestingly, sexual dimorphism was found after weaning. PC males reached the same weight as controls at the end of adolescence (11<sup>th</sup> postnatal week) whereas PC females did not reach it during the periods evaluated in the present study. Equally, the caloric intake relative to body weight of PC males increased during infancy, whereas caloric intake of PC female was higher during adolescence and the first part of adulthood. These data suggest that PC males displayed a delayed catch-up growth. This is a common finding in animal models of caloric and protein restriction when this encompasses both pregnancy and lactation. In these

experiments, the offspring weaned on standard chow diet *ad libitum* usually exhibit hyperphagia until they reach the weight as controls [65,66]. Curiously, in our study the PC females kept lower weight during all the periods evaluated and they displayed hyperphagia during a great part of their life. Hence, this suggests that the compensatory hyperphagia was not able to modify the PC female growth and, therefore, they did not show catch-up growth.

Regarding the development of pathological phenotypes in adulthood, the delayed catch-up growth following malnutrition and underweight at birth has been considered as less deleterious when it has been compared to an early catch-up growth [65,66]. Furthermore, the prevention of the early catch-up growth has been proposed as a good strategy to prevent the debut of the features of metabolic syndrome later in life [67]. This syndrome has been defined as a combination of several risk factors that include hyperglycemia, increased blood pressure, elevated triglyceride levels, low high-density lipoprotein levels (HDL) and abdominal obesity [68]. However, in our study, PC male offspring, with a delayed catch-up growth, exhibited greater abdominal adiposity, lower HDL and increased LDL as well as hyperleptinemia compared to control male offspring. On the other hand, PC female offspring, without catch-up growth, showed a greater decrease in the levels of HDL, higher LDL and greater perigonadal adiposity than control female offspring at adulthood. Additionally, PC offspring of both sexes displayed alterations in the plasma metabolites of lipid metabolism such as higher levels of triglycerides and VLDL. These data demonstrate that PC offspring displayed signs of metabolic syndrome later in life, despite of the fact they exhibited a delayed or absent catch-up growth. Therefore, in animals perinatally exposed to a maternal cafeteria (hypercaloric and hypoproteic palatable diet) that were underweight at birth, the type of catch-up growth is not always a good predictor of the development of metabolic syndrome later in life.

According to our findings, the exposure to junk food or a high fat diet during the perinatal period has been associated to metabolic abnormalities as well, including higher adiposity in both sexes even though animals are weaned on standard chow [10–12]. In some of these studies [10,11,15], animals were born underweight and showed hyperphagia in different life stages as we have described above. Similarly, previous studies have reported alterations in leptin [10–12]. For instance, the exposure to junk food in pregnancy and lactation could lead to higher leptin expression in adipose tissue of male offspring even though animals were weaned on standard chow [12]. This finding is not surprising as leptin is involved in adipose tissue control. Indeed, in our experiments PC males exhibited the highest abdominal adiposity and, hence, they displayed higher levels of leptin as well. Additionally, previous studies have shown alteration in NEFA and/or plasma triglycerides in animals exposed to maternal high fat diet but weaned on standard chow [9,10]. Also, PC animals did not show greater plasma glucose than their respective controls. These outcomes were comparable to results previously described [12], but they differ from others [9,10]. It is important to note that in these studies the offspring were weaned on a standard chow diet. When animals are weaned on junk food or a high-fat diet, exacerbation of these metabolic abnormalities has been demonstrated [8,9,12,13]. Therefore, the significant alterations detected in the present study highlight the importance of the nutritional environment during the perinatal period, independent of the postnatal diet.

### Maternal highly palatable food modifies the profile of several genes involved in metabolism including ECS gene expression

To date, modifications in the expression of several components of the endocannabinoid system after chronic high-fat feeding or continuous access to a highly palatable food has been shown in important structures regulating metabolism such as several brain regions as we reviewed above [32,62,63,69]. To our knowledge, our study is the first that evaluates the expression of

several components of ECS after maternal exposure to a highly palatable food. Previously, our team has detected alterations in hypothalamic endocannabinoids levels at birth in animals exposed to a highly palatable diet during pregestational and gestational periods [36]. Here, we have detected modifications in the ECS gene expression in the hypothalamus, liver and PAT of adult animals exposed to an inadequate maternal diet during the perinatal period.

Since the hypothalamus is a brain area involved in energy homeostasis, food intake and body weight [70], in the present study we aimed to evaluate the gene expression of ECS components in this brain structure. Regarding male offspring, we did not detect any differences in the expression of any component of the ECS including the CB1 receptor. However, it could be possible there are changes in the ECS gene expression in the hypothalamic regions implicated in the regulation of anorexigenic neuropeptides such as the arcuate nucleus [71]. Our finding is not surprising considering that these animals only showed hyperphagia during infancy and, hence, they could reach the weight as controls later in life. However, they displayed a differential response to AM251 and lower chocolate preference. Previous studies have pointed out that the reward system could be modified after hypercaloric diets without changes in the hypothalamus [51,62], although specific areas of the hypothalamus have been altered after chronic consumption of palatable foods as well [63]. After analyzing the hypothalamus, we cannot discard modifications in specific hypothalamic areas involved in food preference. On the other hand, we observed that PC females, which displayed hyperphagia until the 15<sup>th</sup> postnatal week, showed an increase in the gene expression of *Cnr1* in the hypothalamus. These results are in agreement with previous studies that have shown the involvement of CB1 receptors in food intake. Thus, the deletion of a CB1 receptor has been associated to hypophagia and leanness [72,73], whereas obesity has been associated to the overexpression of neuropeptide Y (which displays orexigen properties) and higher levels of 2-AG in the hypothalamus [74]. However, in our experiments PC females remained leaner than CC females throughout the study despite presenting hyperphagia during part of their life. This apparent discrepancy could be explained by an excess of energy expenditure that could be independent of the activation of the hypothalamic CB1 receptors. Indeed, the over-expression of CB2 receptors in brain regions, including several hypothalamic nuclei, has been associated with a lean phenotype [75]. Similarly, in our experiments PC females had a great tendency to exhibit increased *Cnr2* gene expression (Fig 6B).

Moreover, we evaluated the gene expression of ECS components in the liver, another important structure regulating energy balance. Here, we found alterations in the expression of the metabolic enzymes *Napepld*, *Faah*, *Daglβ* and *Mgll* in offspring from free choice dams, without any modifications in *Cnr1*, the lipogenic enzymes *Acaca* and *Scd1*, or the  $\beta$ -oxidation enzyme *Cpt1a*. Specifically, PC females showed a decreased expression of *Mgll*, which is the most important 2-AG-degrading enzyme [76]. We also detected a perinatal diet effect on the gene expression of *Faah*, which is a main catabolic enzyme of anandamide that can also degrade 2-AG [77]. Therefore, the lower expression of these endocannabinoid-degrading enzymes could have led to higher endocannabinoid levels after chronic exposure to high-fat diet as it has been previously reported [78]. These findings result particularly interesting due to the fact that both, anandamide and 2-AG in the liver, decreased the gene expression of Apolipoprotein A-I, the primary protein component of HDLc, through CB1 receptor activation [79]. Hence, the decreased expression of *Mgll* and *Faah* could lead to increased endocannabinoid levels that could decrease more strongly the serum HDL in PC female offspring, as we commented previously, despite the normal expression of *Cnr1*. Although *Cnr1* was not overexpressed in our experiments, maybe as a consequence of a standard diet feeding, the increased endocannabinoid levels could reflect hyperactivation of CB1 receptors. On the other hand, the deficiency of *Mgll* has been linked to attenuation of diet-induced obesity and improvement of atherosclerosis

via CB2 receptor activation [80,81]. Accordingly, we noticed that the liver of females from both perinatal groups displayed higher *Cnr2* gene expression. Therefore, it can be hypothesized that the leanness exhibited by PC females might depend on the lower MAGL expression and a putative CB2 receptor activation.

Regarding perirenal adipose tissue, we detected that PC males with hyperleptinemia and higher abdominal adiposity including perirenal adiposity, exhibited reduced levels in the gene expression of *Faah* and *Daglβ* when they were compared to CC males. Considering that *Faah* is the catabolic enzyme which can degrade AEA and 2-AG, and *Daglβ* is the enzyme that synthesizes 2-AG, the data suggest that these animals could present higher anandamide levels in the white adipose tissue as it has been reported previously [82]. This could lead to an increase in lipogenesis and, therefore, fat storage (adiposity) after the stimulation of CB1 receptors [72]. Indeed, the PAT of PC males presented an increased gene expression of the *de novo* lipogenic enzyme *Acaca*. This is an important enzyme that catalyzes the synthesis of malonyl-CoA from acetyl-CoA, which finally favors the fatty acids synthesis [83]. Thus, the increased perirenal adiposity and leptinemia found in PC males is likely associated to the over-expression of *Acaca*. On the other hand, it has been found that leptin suppresses lipogenesis in the white adipose tissue via central mechanisms. In contrast, leptin cannot inhibit it when there is activation of CB1 receptors [84]. Accordingly, we noticed higher leptin levels without modifications in food intake that suggest leptin resistance and therefore an altered leptin signaling [85]. Although in PC males there were no differences in the gene expression of *Cnr1*, it is possible that an excessive activation of these receptors, maybe for increased endocannabinoid levels, could impact on the greater adiposity found. In contrast, PC females with higher perigonadal adiposity but not perirenal adiposity, exhibited greater gene expression of *Cnr1* in PAT, when compared to CC females. These results are in agreement to previous reports after chronic exposure to high-carbohydrate diets [86]. Curiously, this increment was not accompanied by other alterations in fatty acid metabolism genes and leptinemia, which suggests an isolated effect. However, female offspring from both perinatal groups, and more specifically PC females, displayed higher gene expression of *Cnr2*. Hence, one possibility that emerges from this finding is that the modifications found in *Cnr1* in female offspring could not have an impact on other metabolic outcomes as a consequence of the protective effect caused by the stimulation of the CB2 receptor. Indeed, an improvement of the obese phenotype after CB2 receptor activation has been shown in animals with diet-induced obesity [87].

On the other hand, we observed a lower gene expression of *Pparγ* in the liver and PAT of the offspring from P dams. PPAR $\gamma$  is a nuclear receptor that regulates the expression of lipid metabolism-related genes together with other PPARs. PPAR $\gamma$  plays an important role in the modulation of adipocyte hypertrophy and insulin resistance after exposure to a high-fat diet [88]. Moreover, chronic activation by cannabinoid agonists stimulates PPAR $\gamma$ , which is a signal of adipocyte differentiation in early stages [89]. Similarly, the down-regulation of PPAR $\gamma$  has been described previously in animal models after the chronic exposure to high-fat/high-sucrose diet in adipose tissue and/or liver [90,91]. Indeed, the down-regulation has been associated with altered metabolic phenotype [90]. Regarding our study, the significant down-expression of *Pparγ* in the liver of PC males suggest a reduction of fatty acid uptake in liver, which could be related to the increased levels of triglycerides in plasma and, in turn, the increased expression of the lipogenic enzyme *Acaca* in PAT. On the other hand, the decreased expression of *Pparγ* and the eCBs-degrading enzymes *Faah* and *Mgl1* in the liver of PC females might indicate a hypersensitization of the PPAR $\gamma$ /cannabinoid receptor activity, which may be associated to an alteration of fatty acid uptake, cholesterol profile and hepatic transaminases.

## Sexual dimorphism after the exposure to a highly palatable food

The data previously discussed emphasize that the perinatal nutritional conditions differentially impact male and female offspring. Thus, when PC males were compared to control offspring, they displayed normoweight, increased abdominal adiposity, hyperleptinemia, alterations in the lipid plasmatic profile, altered response to AM251 and alteration in the expression of metabolic enzymes of the ECS and *Acaca* enzyme in perirenal adipose tissue. In contrast, when PC female offspring were compared to control female, they were underweight. They exhibited hyperphagia during part of their life, increased perigonadal adiposity but not abdominal adiposity, alterations in lipoproteins including strong reduction of HDL and higher *Cnr1* expression in hypothalamus and PAT, along with lower expression of endocannabinoid-degrading enzymes in the liver. These findings are in agreement with previous studies that have shown sex-specific profiles after the exposure to maternal junk food or high-fat diets as well [10,12–14].

Regarding the possible explanations of the sexual dimorphism documented the importance of genomic imprinting and the role of placenta during early pregnancy has been pointed out. Thus, sexual-specific alterations in DNA methylation in the placenta after high-fat feeding during pregnancy has been documented, which highlights the importance of early nutritional conditions [92]. On the other hand, the differences in gonadal hormones cannot be discarded. For instance, a previous research has documented sexual dimorphism in ECS as well, showing fluctuations in the expression of cannabinoid receptors during the estrous cycle and after gonadectomy in females [61].

In our study, the phenotype exhibited by PC females seemed more resistant to the developmental programming, even though they displayed altered *Cnr1* gene expression. However, these modifications in gene expression suggest that in harmful conditions the vulnerability of diseases could increase. For instance, the onset of menopause and the cessation of estrogens have been linked to metabolic diseases [93]. According to this, the study developed by Dahlhoff et al [13] showed that the differences between male and female offspring were less pronounced at the age of 9 months than at 5 months. Considering that the beginning of irregular cycles in female mice is around 8 months of age [94], it is possible that a reduction in estrogens could explain these differences. In our study, we realized that female offspring displayed higher gene expression of *Cnr2* at the 5<sup>th</sup> postnatal month. This receptor is involved in ovulation [95], and the stimulation by a CB2 receptor agonist has demonstrated an anti-obesity effect [87]. Consequently, it could be speculated that the up-regulation of this receptor in females could exhibit a protective role against metabolic diseases until menopause.

## Conclusions

The data demonstrate that exposure to a maternal palatable diet since the preconception period predisposes animals to develop features of metabolic syndrome, and affect the feeding behavior, including the differential response to the inverse cannabinoid agonist AM251, and the expression of genes involved in cannabinoid and lipid metabolism of the offspring in a sex-specific manner, even though the animals are weaned on standard chow diet. The increased expression of *Cnr1* in the hypothalamus and PAT of PC female offspring suggest a hyposensitization of the cannabinoid activity, which may result in a reduction in chocolate preference, leptinemia and body weight at adulthood. However, the decreased expression of *Pparγ* and the eCBs-degrading enzymes *Faah* and *Mgll* in the liver of PC females suggest a hypersensitization of the PPAR $\gamma$ /cannabinoid receptor activity (*Cnr1* showed a tendency to decrease), which may result in an alteration of fatty acid uptake, cholesterol profile and hepatic transaminases. The decreased expression of the NAEs-degrading enzyme *Faah* and the AGs-synthesizing enzyme



*Daglβ* in the PAT of PC males suggest an increase in the AEA tone and a decrease in the 2-AG tone, which may finally result in an increase in *de novo* lipogenesis (*Acaca*) in PAT and a decrease in the lipid uptake (*Pparγ*) in the liver, as well as perirenal adiposity and leptinemia. These outcomes are independent of the postnatal diet. These results emphasize the importance of nutritional conditions during these critical windows in the development of the abnormal phenotype exhibited by offspring in a sex-dependent manner. Therefore, we propose that the perinatal exposure to a highly palatable food could program the energy metabolism and feeding behavior by different mechanisms that include the affectation of the ECS. Whether the dysregulation found in the ECS could increase the vulnerability for developing diseases in presence of deleterious dietetic or hormone conditions must be addressed in future studies.

## Supporting Information

### S1 Table. Diet composition.

(DOCX)

### S2 Table. Primer references for TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays (Applied Biosystems).

(DOCX)

## Acknowledgments

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad con-founded by UE-ERDF program (CP12/03109 and PI16/01374 to J.S., PI13/0226 to F.R.F. and PSI-2012-35388 to R.G.H.), Red de Trastornos Adictivos (RD12/0028/0001 to F.R.F.), CIBERobn, Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía, UE/ERDF (PI45403, CTS-8221, CTS-433 to F.R.F.), Consejería de Salud, Junta de Andalucía, UE/ERDF (SAF2010-20521 and SAS111224 to F.R.F. M.T. Ramírez-López has been funded by a FPU predoctoral fellowship of the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (AP-2009-0225). JS holds a “Miguel Servet” research contract from the National System of Health, ISCIII (grant number CP12/03109).

## Author Contributions

**Conceptualization:** FRF RGH JS MRTL.

**Formal analysis:** RA JD JS FA MTRL FRE.

**Funding acquisition:** FRF RGH JS.

**Investigation:** MTRL RB FA JD RA JS MV.

**Methodology:** JD RA JS MV FA FRF RGH MTRL.

**Project administration:** FRE.

**Resources:** RGH JS FRE.

**Supervision:** FRF JS RGH.

**Validation:** RA JD JS MTRL FRE.

**Visualization:** MTRL.

**Writing – original draft:** MTRL RA FRE.

**Writing – review & editing:** RGH FA JD JS.

## References

1. World Health Organization. Global status report of noncommunicable diseases 2014. Geneva: WHO Press; 2014.
2. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract.* 2014; 2014: 943162. doi: [10.1155/2014/943162](https://doi.org/10.1155/2014/943162) PMID: [24711954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24711954/)
3. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 1992; 35(7): 595–601. PMID: [1644236](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1644236/)
4. Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 2004; 15(4): 183–187. doi: [10.1016/j.tem.2004.03.002](https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.03.002) PMID: [15109618](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15109618/)
5. Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med.* 2007; 261(5): 412–417. doi: [10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x) PMID: [17444880](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17444880/)
6. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* 1991; 156: 38–50; discussion 50–5. PMID: [1855415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1855415/)
7. Catalano PM, Farrell K, Thomas A, Huston-Presley L, Mencin P, de Mouzon SH, et al. Perinatal risk factors for childhood obesity and metabolic dysregulation. *Am J Clin Nutr.* 2009; 90(5): 1303–1313. doi: [10.3945/ajcn.2008.27416](https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27416) PMID: [19759171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19759171/)
8. Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH, et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension.* 2008; 51(2): 383–392. doi: [10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.101477](https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.101477) PMID: [18086952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18086952/)
9. Srinivasan M, Katewa SD, Palaniyappan A, Pandya JD, Patel MS. Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 291(4): E792–9. doi: [10.1152/ajpendo.00078.2006](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00078.2006) PMID: [16720630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16720630/)
10. Nivoit P, Morens C, Van Assche FA, Jansen E, Poston L, Remacle C, et al. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia.* 2009; 52(6): 1133–1142. doi: [10.1007/s00125-009-1316-9](https://doi.org/10.1007/s00125-009-1316-9) PMID: [19288075](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19288075/)
11. Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol.* 2009; 587(Pt 4): 905–915. doi: [10.1113/jphysiol.2008.163477](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.163477) PMID: [19103681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19103681/)
12. Bayol SA, Simbi BH, Bertrand JA, Stickland NC. Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females. *J Physiol.* 2008; 586(13): 3219–3230. doi: [10.1113/jphysiol.2008.153817](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.153817) PMID: [18467362](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18467362/)
13. Dahlhoff M, Pfister S, Blutke A, Rozman J, Klingenspor M, Deutsch MJ, et al. Peri-conceptual obesogenic exposure induces sex-specific programming of disease susceptibilities in adult mouse offspring. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842(2): 304–317. doi: [10.1016/j.bbadis.2013.11.021](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.021) PMID: [24275555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24275555/)
14. Dearden L, Balthasar N. Sexual dimorphism in offspring glucose-sensitive hypothalamic gene expression and physiological responses to maternal high-fat diet feeding. *Endocrinology.* 2014; 155(6): 2144–2154. doi: [10.1210/en.2014-1131](https://doi.org/10.1210/en.2014-1131) PMID: [24684305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24684305/)
15. Bayol SA, Farrington SJ, Stickland NC. A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Br J Nutr.* 2007; 98(4): 843–851. doi: [10.1017/S0007114507812037](https://doi.org/10.1017/S0007114507812037) PMID: [17697422](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17697422/)
16. Ong ZY, Muhlhausler BS. Maternal "junk-food" feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *FASEB J.* 2011; 25(7): 2167–2179. doi: [10.1096/fj.10-178392](https://doi.org/10.1096/fj.10-178392) PMID: [21427213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21427213/)
17. Vickers MH. Developmental programming and adult obesity: the role of leptin. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2007; 14(1): 17–22. doi: [10.1097/MED.0b013e328013da48](https://doi.org/10.1097/MED.0b013e328013da48) PMID: [17940414](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17940414/)
18. Vucetic Z, Kimmel J, Totoki K, Hollenbeck E, Reyes TM. Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. *Endocrinology.* 2010; 151(10): 4756–4764. doi: [10.1210/en.2010-0505](https://doi.org/10.1210/en.2010-0505) PMID: [20685869](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20685869/)
19. Muhlhausler BS, Adam CL, Findlay PA, Duffield JA, McMillen IC. Increased maternal nutrition alters development of the appetite-regulating network in the brain. *FASEB J.* 2006; 20(8): 1257–1259. doi: [10.1096/fj.05-5241fje](https://doi.org/10.1096/fj.05-5241fje) PMID: [16684802](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16684802/)
20. Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature.* 2001 12; 410(6830): 822–825. doi: [10.1038/35071088](https://doi.org/10.1038/35071088) PMID: [11298451](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11298451/)

21. Cota D, Tschöp MH, Horvath TL, Levine AS. Cannabinoids, opioids and eating behavior: the molecular face of hedonism? *Brain research reviews*. 2006; 51(1): 85–107. doi: [10.1016/j.brainresrev.2005.10.004](https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.10.004) PMID: [16364446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16364446/)
22. Di Marzo V. CB(1) receptor antagonism: biological basis for metabolic effects. *Drug Discov Today*. 2008; 13(23–24): 1026–1041. doi: [10.1016/j.drudis.2008.09.001](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.09.001) PMID: [18824122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18824122/)
23. Mazier W, Saucisse N, Gatta-Cherifi B, Cota D. The Endocannabinoid System: Pivotal Orchestrator of Obesity and Metabolic Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2015; 26(10): 524–537.
24. Keimpema E, Calvigioni D, Harkany T. Endocannabinoid signals in the developmental programming of delayed-onset neuropsychiatric and metabolic illnesses. *Biochem Soc Trans*. 2013; 41(6): 1569–1576. doi: [10.1042/BST20130117](https://doi.org/10.1042/BST20130117) PMID: [24256256](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24256256/)
25. Alen F, Ramirez-Lopez MT, Gomez de Heras R, Rodriguez de Fonseca F, Orio L. Cannabinoid receptors and cholecystokinin in feeding inhibition. *Vitam Horm*. 2013; 92: 165–196. doi: [10.1016/B978-0-12-410473-0.00007-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410473-0.00007-6) PMID: [23601425](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23601425/)
26. Cristino L, Becker T, Di Marzo V. Endocannabinoids and energy homeostasis: an update. *Biofactors*. 2014; 40(4): 389–397. doi: [10.1002/biof.1168](https://doi.org/10.1002/biof.1168) PMID: [24752980](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24752980/)
27. Mackie K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol*. 2005; 168: 299–325.
28. Yoshida R, Ohkuri T, Jyotaki M, Yasuo T, Horio N, Yasumatsu K, et al. Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proceedings of the national Academy of sciences*. 2010; 107(2): 935–939.
29. Droste SM, Saland SK, Schlitter EK, Rodefer JS. AM 251 differentially effects food-maintained responding depending on food palatability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2010; 95(4): 443–448.
30. Mathes CM, Ferrara M, Rowland NE. Cannabinoid-1 receptor antagonists reduce caloric intake by decreasing palatable diet selection in a novel dessert protocol in female rats. *American Journal of Physiology—Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2008; 295(1): R67–R75. doi: [10.1152/ajpregu.00150.2008](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00150.2008) PMID: [18448611](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18448611/)
31. Tibirica E. The multiple functions of the endocannabinoid system: a focus on the regulation of food intake. *Diabetol Metab Syndr*. 2010; 2: 5. doi: [10.1186/1758-5996-2-5](https://doi.org/10.1186/1758-5996-2-5) PMID: [20180990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20180990/)
32. Bello NT, Coughlin JW, Redgrave GW, Ladenheim EE, Moran TH, Guarda AS. Dietary conditions and highly palatable food access alter rat cannabinoid receptor expression and binding density. *Physiol Behav*. 2012; 105(3): 720–726. doi: [10.1016/j.physbeh.2011.09.021](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.09.021) PMID: [22005165](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22005165/)
33. Starowicz KM, Cristino L, Matias I, Capasso R, Racioppi A, Izzo AA, et al. Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*. 2008; 16(3): 553–565.
34. Artmann A, Petersen G, Hellgren LI, Boberg J, Skonberg C, Nellesmann C, et al. Influence of dietary fatty acids on endocannabinoid and N-acyl ethanolamine levels in rat brain, liver and small intestine. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1781(4): 200–212. doi: [10.1016/j.bbali.2008.01.006](https://doi.org/10.1016/j.bbali.2008.01.006) PMID: [18316044](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18316044/)
35. Berger A, Crozier G, Bisogno T, Cavaliere P, Innis S, Di Marzo V. Anandamide and diet: inclusion of dietary arachidonate and docosahexaenoate leads to increased brain levels of the corresponding N-acyl ethanolamines in piglets. *Proceedings of the national Academy of sciences*. 2001; 98(11): 6402.
36. Ramirez-Lopez MT, Vazquez M, Bindila L, Lomazzo E, Hofmann C, Blanco RN, et al. Exposure to a Highly Caloric Palatable Diet During Pregestational and Gestational Periods Affects Hypothalamic and Hippocampal Endocannabinoid Levels at Birth and Induces Adiposity and Anxiety-Like Behaviors in Male Rat Offspring. *Front Behav Neurosci*. 2016; 9: 339. doi: [10.3389/fnbeh.2015.00339](https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00339) PMID: [26778987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26778987/)
37. Martin-Garcia E, Burokas A, Martin M, Berrendero F, Rubi B, Kiesselbach C, et al. Central and peripheral consequences of the chronic blockade of CB1 cannabinoid receptor with rimonabant or taranabant. *J Neurochem*. 2010; 112(5): 1338–13351. doi: [10.1111/j.1471-4159.2009.06549.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06549.x) PMID: [20028452](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20028452/)
38. Heyne A, Kiesselbach C, Sahun I, McDonald J, Gaiffi M, Dierssen M, et al. An animal model of compulsive food-taking behaviour. *Addict Biol*. 2009; 14(4): 373–383. doi: [10.1111/j.1369-1600.2009.00175.x](https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2009.00175.x) PMID: [19740365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19740365/)
39. McClintock MK. Estrous synchrony: modulation of ovarian cycle length by female pheromones. *Physiol Behav* 1984; 32(5): 701–705. PMID: [6541794](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6541794/)
40. Schank JC. Avoiding synchrony as a strategy of female mate choice. *Nonlinear Dynamics Psychol Life Sci*. 2004; 8(2): 147–176. PMID: [15068734](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15068734/)
41. Schank JC. Do Norway rats (*Rattus norvegicus*) synchronize their estrous cycles? *Physiol Behav*. 2001; 72(1): 129–139.

42. Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 279(1): E83–7. PMID: [10893326](#)
43. Gomez R, Navarro M, Ferrer B, Trigo JM, Bilbao A, Del Arco I, et al. A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J Neurosci.* 2002; 22(21): 9612–9617. PMID: [12417686](#)
44. Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Alvarez E, Roncero I, Chowen JA, Maestre O, et al. Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. *Metabolism.* 2000; 49(6): 709–717. doi: [10.1053/meta.2000.6251](#) PMID: [10877194](#)
45. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 4<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press; 1998.
46. Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cut-points. *Clin Chem.* 1990; 36(1): 15–19. PMID: [2297909](#)
47. Ahmadi S, Boroumand M, Gohari-Moghaddam K, Tajik P, Dibaj S. The impact of low serum triglyceride on LDL-cholesterol estimation. *Archives of Iranian medicine.* 2008; 11(3): 318. PMID: [18426324](#)
48. Decara JM, Romero-Cuevas M, Rivera P, Macias-Gonzalez M, Vida M, Pavon FJ, et al. Elaidyl-sulfamide, an oleoylethanolamide-modelled PPARalpha agonist, reduces body weight gain and plasma cholesterol in rats. *Dis Model Mech.* 2012; 5(5): 660–670. doi: [10.1242/dmm.009233](#) PMID: [22736460](#)
49. Brion MJ, Ness AR, Rogers I, Emmett P, Cribb V, Davey Smith G, et al. Maternal macronutrient and energy intakes in pregnancy and offspring intake at 10 y: exploring parental comparisons and prenatal effects. *Am J Clin Nutr.* 2010; 91(3): 748–756. doi: [10.3945/ajcn.2009.28623](#) PMID: [20053880](#)
50. Mennella JA, Griffin CE, Beauchamp GK. Flavor programming during infancy. *Pediatrics.* 2004; 113(4): 840–845. PMID: [15060236](#)
51. Vucetic Z, Kimmel J, Reyes TM. Chronic high-fat diet drives postnatal epigenetic regulation of mu-opioid receptor in the brain. *Neuropsychopharmacology.* 2011; 36(6): 1199–1206. doi: [10.1038/npp.2011.4](#) PMID: [21326195](#)
52. Fromentin G, Gietzen DW, Nicolaidis S. Aversion-preference patterns in amino acid- or protein-deficient rats: a comparison with previously reported responses to thiamin-deficient diets. *Br J Nutr.* 1997; 77(2): 299–314. PMID: [9135374](#)
53. Orloff NC, Hormes JM. Pickles and ice cream! Food cravings in pregnancy: hypotheses, preliminary evidence, and directions for future research. *Front Psychol.* 2014; 5:1076. doi: [10.3389/fpsyg.2014.01076](#) PMID: [25295023](#)
54. Hook EB. Influence of pregnancy on dietary selection. *Int J Obes.* 1980; 4(4): 338–340. PMID: [7419353](#)
55. Cota D, Steiner MA, Marsicano G, Cervino C, Herman JP, Grubler Y, et al. Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Endocrinology.* 2007; 148(4): 1574–1581. doi: [10.1210/en.2005-1649](#) PMID: [17194743](#)
56. DiPatrizio NV, Simansky KJ. Activating parabrachial cannabinoid CB1 receptors selectively stimulates feeding of palatable foods in rats. *J Neurosci.* 2008; 28(39): 9702–9709. doi: [10.1523/JNEUROSCI.1171-08.2008](#) PMID: [18815256](#)
57. Blasio A, Rice KC, Sabino V, Cottone P. Characterization of a shortened model of diet alternation in female rats: effects of the CB1 receptor antagonist rimonabant on food intake and anxiety-like behavior. *Behav Pharmacol.* 2014; 25(7): 609–617. PMID: [25011007](#)
58. Deshmukh RR, Sharma PL. Stimulation of accumbens shell cannabinoid CB(1) receptors by noladin ether, a putative endocannabinoid, modulates food intake and dietary selection in rats. *Pharmacol Res.* 2012; 66(3): 276–282. doi: [10.1016/j.phrs.2012.06.004](#) PMID: [22728691](#)
59. Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006; 361(1471): 1251–1263. doi: [10.1098/rstb.2006.1860](#) PMID: [16815802](#)
60. Primeaux SD. QRFP in female rats: effects on high fat food intake and hypothalamic gene expression across the estrous cycle. *Peptides.* 2011; 32(6): 1270–1275. doi: [10.1016/j.peptides.2011.03.022](#) PMID: [21473894](#)
61. Rodriguez de Fonseca F, Cebeira M, Ramos JA, Martin M, Fernandez-Ruiz JJ. Cannabinoid receptors in rat brain areas: sexual differences, fluctuations during estrous cycle and changes after gonadectomy and sex steroid replacement. *Life Sci.* 1994; 54(3): 159–170. PMID: [8289577](#)
62. Harrold JA, Elliott JC, King PJ, Widdowson PS, Williams G. Down-regulation of cannabinoid-1 (CB-1) receptors in specific extrahypothalamic regions of rats with dietary obesity: a role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food? *Brain Res.* 2002; 952(2): 232–238. PMID: [12376184](#)

63. Timofeeva E, Baraboi ED, Poulin AM, Richard D. Palatable high-energy diet decreases the expression of cannabinoid type 1 receptor messenger RNA in specific brain regions in the rat. *J Neuroendocrinol.* 2009; 21(12): 982–992. doi: [10.1111/j.1365-2826.2009.01921.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01921.x) PMID: [19807847](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19807847/)
64. Brand T, Spanagel R, Schneider M. Decreased reward sensitivity in rats from the Fischer344 strain compared to Wistar rats is paralleled by differences in endocannabinoid signaling. *PLoS One.* 2012; 7(2): e31169. doi: [10.1371/journal.pone.0031169](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031169) PMID: [22347447](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22347447/)
65. Coupe B, Grit I, Darmaun D, Parnet P. The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 297(3): R813–24. doi: [10.1152/ajpregu.00201.2009](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00201.2009) PMID: [19605764](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19605764/)
66. Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 288(1): R91–6. doi: [10.1152/ajpregu.00340.2004](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00340.2004) PMID: [15297266](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15297266/)
67. Jimenez-Chillaron JC, Hernandez-Valencia M, Lightner A, Faucette RR, Reamer C, Przybyla R, et al. Reductions in caloric intake and early postnatal growth prevent glucose intolerance and obesity associated with low birthweight. *Diabetologia.* 2006; 49(8): 1974–1984. doi: [10.1007/s00125-006-0311-7](https://doi.org/10.1007/s00125-006-0311-7) PMID: [16761107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16761107/)
68. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009; 120(16): 1640–1645. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644) PMID: [19805654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19805654/)
69. Cluny NL, Baraboi ED, Mackie K, Burdya G, Richard D, Dockray GJ, et al. High fat diet and body weight have different effects on cannabinoid CB(1) receptor expression in rat nodose ganglia. *Auton Neurosci.* 2013; 179(1–2): 122–130. doi: [10.1016/j.autneu.2013.09.015](https://doi.org/10.1016/j.autneu.2013.09.015) PMID: [24145047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24145047/)
70. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006; 443(7109): 289–295. doi: [10.1038/nature05026](https://doi.org/10.1038/nature05026) PMID: [16988703](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16988703/)
71. Lage R, Parisi C, Seoane-Collazo P, Ferno J, Mazza R, Bosch F, et al. Lack of Hypophagia in CB1 Null Mice is Associated to Decreased Hypothalamic POMC and CART Expression. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2015; 18(9). pii: pyv011. doi: [10.1093/ijnp/pyv011](https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv011) PMID: [25655433](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25655433/)
72. Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, et al. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *Journal of clinical investigation.* 2003; 112(3): 423–431. doi: [10.1172/JCI17725](https://doi.org/10.1172/JCI17725) PMID: [12897210](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12897210/)
73. Ravinet Trillou C, Delgorge C, Menet C, Arnome M, Soubrie P. CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004; 28(4): 640–648. doi: [10.1038/sj.ijo.0802583](https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802583) PMID: [14770190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14770190/)
74. Vahatalo LH, Ruohonen ST, Makela S, Ailanen L, Penttinen AM, Stormi T, et al. Role of the endocannabinoid system in obesity induced by neuropeptide Y overexpression in noradrenergic neurons. *Nutr Diabetes.* 2015; 5: e151. doi: [10.1038/nutd.2015.1](https://doi.org/10.1038/nutd.2015.1) PMID: [25915740](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25915740/)
75. Romero-Zerbo SY, Garcia-Gutierrez MS, Suarez J, Rivera P, Ruz-Maldonado I, Vida M, et al. Overexpression of cannabinoid CB2 receptor in the brain induces hyperglycaemia and a lean phenotype in adult mice. *J Neuroendocrinol.* 2012; 24(8): 1106–1119. doi: [10.1111/j.1365-2826.2012.02325.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02325.x) PMID: [22487302](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22487302/)
76. Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the national Academy of sciences.* 2002; 99(16): 10819–10824.
77. Di Marzo V, Maccarrone M. FAAH and anandamide: is 2-AG really the odd one out? *Trends Pharmacol Sci.* 2008; 29(5): 229–233. doi: [10.1016/j.tips.2008.03.001](https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.03.001) PMID: [18394720](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18394720/)
78. Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest.* 2005; 115(5): 1298–305. doi: [10.1172/JCI23057](https://doi.org/10.1172/JCI23057) PMID: [15864349](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15864349/)
79. Haas MJ, Mazza AD, Wong NC, Mooradian AD. Inhibition of apolipoprotein A-I gene expression by obesity-associated endocannabinoids. *Obesity (Silver Spring).* 2012; 20(4): 721–729.
80. Vujic N, Schlager S, Eichmann TO, Madreiter-Sokolowski CT, Goeritzer M, Rainer S, et al. Monoglyceride lipase deficiency modulates endocannabinoid signaling and improves plaque stability in ApoE-knockout mice. *Atherosclerosis.* 2016; 244:9–21. doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.109](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.109) PMID: [26584135](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26584135/)
81. Taschler U, Radner FP, Heier C, Schreiber R, Schweiger M, Schoiswohl G, et al. Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance. *J Biol Chem.* 2011; 286(20): 17467–17477. doi: [10.1074/jbc.M110.215434](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.215434) PMID: [21454566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21454566/)

82. Tourino C, Oveisi F, Lockney J, Piomelli D, Maldonado R. FAAH deficiency promotes energy storage and enhances the motivation for food. *Int J Obes (Lond)*. 2010; 34(3): 557–568.
83. Strable MS, Ntambi JM. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2010; 45(3): 199–214. doi: [10.3109/10409231003667500](https://doi.org/10.3109/10409231003667500) PMID: [20218765](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20218765/)
84. Buettner C, Muse ED, Cheng A, Chen L, Scherer T, Poci A, et al. Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nature medicine*. 2008; 14(6): 667–675. doi: [10.1038/nm1775](https://doi.org/10.1038/nm1775) PMID: [18516053](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18516053/)
85. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998; 395(6704): 763–770. doi: [10.1038/27376](https://doi.org/10.1038/27376) PMID: [9796811](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9796811/)
86. Vida M, Rivera P, Gavito AL, Suarez J, Pavon FJ, Arrabal S, et al. CB1 blockade potentiates down-regulation of lipogenic gene expression in perirenal adipose tissue in high carbohydrate diet-induced obesity. *PLoS One* 2014; 9(2):e90016. doi: [10.1371/journal.pone.0090016](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090016) PMID: [24587189](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24587189/)
87. Verty AN, Stefanidis A, McAinch AJ, Hryciw DH, Oldfield B. Anti-Obesity Effect of the CB2 Receptor Agonist JWH-015 in Diet-Induced Obese Mice. *PLoS One*. 2015 Nov 20; 10(11):e0140592.
88. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Kameda K, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*. 1999; 4(4): 597–609. PMID: [10549291](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10549291/)
89. Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, et al. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(8): 3171–3180. doi: [10.1210/jc.2005-2679](https://doi.org/10.1210/jc.2005-2679) PMID: [16684820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16684820/)
90. Ragab SM, Abd Elghaffar SK, El-Metwally TH, Badr G, Mahmoud MH, Omar HM. Effect of a high fat, high sucrose diet on the promotion of non-alcoholic fatty liver disease in male rats: the ameliorative role of three natural compounds. *Lipids Health Dis*. 2015; 14:83. doi: [10.1186/s12944-015-0087-1](https://doi.org/10.1186/s12944-015-0087-1) PMID: [26228038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26228038/)
91. Alonso M, Serrano A, Vida M, Crespillo A, Hernandez-Folgado L, Jagerovic N, et al. Anti-obesity efficacy of LH-21, a cannabinoid CB(1) receptor antagonist with poor brain penetration, in diet-induced obese rats. *Br J Pharmacol*. 2012; 165(7): 2274–2291. doi: [10.1111/j.1476-5381.2011.01698.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01698.x) PMID: [21951309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21951309/)
92. Gallou-Kabani C, Gabory A, Tost J, Karimi M, Mayeur S, Lesage J, et al. Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet. *PLoS One*. 2010; 5(12): e14398. doi: [10.1371/journal.pone.0014398](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014398) PMID: [21200436](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21200436/)
93. Polotsky HN, Polotsky AJ. Metabolic implications of menopause. *Semin Reprod Med*. 2010; 28(5): 426–434. doi: [10.1055/s-0030-1262902](https://doi.org/10.1055/s-0030-1262902) PMID: [20865657](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20865657/)
94. Diaz Brinton R. Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. *Endocrinology*. 2012; 153(8): 3571–3578. doi: [10.1210/en.2012-1340](https://doi.org/10.1210/en.2012-1340) PMID: [22778227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22778227/)
95. El-Talatini MR, Taylor AH, Elson JC, Brown L, Davidson AC, Konje JC. Localisation and function of the endocannabinoid system in the human ovary. *PLoS One*. 2009; 4(2): e4579. doi: [10.1371/journal.pone.0004579](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004579) PMID: [19238202](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19238202/)

## 2.2.2 Datos complementarios al artículo 6

En este apartado se incluyen los datos suplementarios publicados junto al artículo 6, que específicamente se denominan **table S1** y **table S2**.

**Table S1.** Diet composition

Diet	Protein	Carbohydrate		Fat			Fiber	Sodium	Energy
		Overall	Simple carbohydrates	Overall	Saturated fatty acid	Unsaturated fatty acid			
Standard chow	16.1%	60.0%	3.3%	3.1%	22.20%	77.70%	4.0%	0.003%	2.9 Kcal/g.
Chocolate Mixture	6.0%	60.4%	89.0%	24.45%	56.2%	43.88%	1.45%	0.17%	4.88 Kcal/g

**Table S2.** Primer references for TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems)

Gene description	Assay ID	N° accession GenBank	Amplicon Length
<i>Actb</i> (Beta actin)	Rn00667869_m1	NM_031144.2	91
<i>Cnr1</i> (cannabinoid receptor 1)	Rn02758689_s1	NM_012784.4	92
<i>Cnr2</i> (cannabinoid receptor 2)	Rn03993699_s1	NM_001164142.1	102
<i>Dagla</i> (diacylglycerol lipase, alpha)	Rn01454304_m1	NM_001005886.1	67
<i>Daglb</i> (diacylglycerol lipase, beta)	Rn01453770_m1	NM_001107120.1	57
<i>Faah</i> (fatty acid amide hydrolase)	Rn00577086_m1	NM_024132.3	63
<i>Mgll</i> (monoglyceride lipase)	Rn00593297_m1	NM_138502.2	78
<i>Napepld</i> (N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D)	Rn01786262_m1	NM_199381.1	71
<i>Acaca</i> (acetyl-CoA carboxylase alpha)	Rn00573474_m1	NM_022193.1	60
<i>Scd1</i> (stearoyl-Coenzyme A desaturase 1)	Rn00594894_g1	NM_139192.2	86
<i>Cpt1a</i> (carnitine palmitoyltransferase 1a, liver)	Rn00580702_m1	NM_031559.2	64
<i>Cpt1b</i> (carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle)	Rn00682395_m1	NC_005106.4	83
<i>Ppara</i> (peroxisome proliferator activated receptor alpha)	Rn00566193_m1	NM_013196.1	98
<i>Pparγ</i> (peroxisome proliferator activated receptor gamma)	Rn00440945_m1	NC_005103.4	105





## DISCUSIÓN INTEGRADORA

En este apartado se comentarán los principales resultados de la tesis doctoral considerando la importancia que los mismos tienen en el contexto de la programación metabólica y conductual. Teniendo en cuenta que ya varios de estos aspectos han sido tratados en los apartados de discusión de los artículos, se prestará especial atención a los factores comunes entre los modelos de dieta materna estudiados, así como a las divergencias. Se comprobará además, si los resultados obtenidos por los modelos implementados en esta investigación apoyan las hipótesis inicialmente planteadas.



Existe una creciente evidencia apoyando la idea de que la exposición a determinadas condiciones ambientales en periodos críticos del desarrollo aumenta la vulnerabilidad a padecer ciertos trastornos metabólicos de elevada prevalencia en etapas posteriores, entre los que se incluyen las enfermedades cardiovasculares (Wachs, Georgieff, Cusick, & McEwen, 2014; World Health Organization, 2014; Barker, 2007). Considerando además la asociación que presentan estas patologías con ciertos trastornos conductuales (Phillips & Perry, 2015; Huang et al., 2013; VanBuskirk & Potenza, 2010; PStunkard et al., 2003), que a su vez podrían tener un origen temprano (Akitake et al., 2015; Sullivan, Nousen, & Chamlou, 2014; Wachs et al., 2014), se hace muy necesaria la búsqueda de intervenciones efectivas que palien sus consecuencias y/o impidan su aparición (Wachs et al., 2014; World Health Organization, 2014). Entre las mismas se incluyen las medidas de prevención primaria y la búsqueda de terapias eficaces para poder revertir o paliar los trastornos, una vez se hayan producido.

Dentro de las medidas de prevención primaria resalta la importancia de evaluar las condiciones nutricionales en los periodos críticos del desarrollo, que incluyan no sólo la gestación y lactancia, sino también el periodo pregestacional. Particularmente, el diseño experimental que hemos implementado en nuestra investigación, en el cual los descendientes estuvieron únicamente expuestos a las condiciones nutricionales inadecuadas en el periodo perinatal (pregestacional, gestacional y/o lactancia), junto con nuestros hallazgos, realzan el papel de la dieta materna en la programación. De esta manera, hemos constatado que tanto la exposición perinatal a una dieta materna restringida como a una dieta hipercalórica altamente palatable, se asocian a alteraciones metabólicas y conductuales en etapas posteriores de la vida, de forma similar a lo descrito por otros autores (Akitake et al., 2015; Cunha Fda et al., 2015; Sullivan et al., 2014; Suzuki, Jayasena, & Bloom, 2011; Theys, Ahn, Bouckenooghe, Reusens, & Remacle, 2011; Ong & Muhlhausler, 2011; Catalano et al., 2009; Bayol et al., 2008; Howie, Sloboda, Kamal, & Vickers, 2009; Barker, 2007; Roseboom, de Rooij, & Painter, 2006; Srinivasan, Katewa, Palaniyappan, Pandya, & Patel, 2006; Khan et al., 2005; Ravelli et al., 1999).

Para entender la complejidad del proceso de programación e intentar encontrar medidas eficaces que puedan prevenirlo, revertirlo o atenuar sus consecuencias, la identificación de los mecanismos biológicos subyacentes al fenómeno ha sido considerada una estrategia muy acertada (Langley-Evans, 2013). Los modelos animales, de forma general, han permitido detectar hasta la fecha numerosos mecanismos involucrados en la programación.

(Godfrey et al., 2011; Vucetic, Kimmel, Totoki, Hollenbeck, & Reyes, 2010; Coupe, Amarger, Grit, Benani, & Parnet, 2010; Breton et al., 2009; Coupe et al., 2009; Phillips et al., 2000). Sin embargo, poca ha sido la investigación realizada en relación al sistema endocannabinoide en este contexto, pese a que el mismo está estrechamente relacionado con otros mecanismos biológicos más estudiados (Keimpema, Hokfelt, Harkany, & Doherty, 2014; Cota et al., 2006; V. Di Marzo et al., 2001). Específicamente, la presente investigación por primera vez ha vinculado el desarrollo de anormalidades metabólicas y conductuales en la descendencia tras la exposición a una dieta materna inadecuada, con alteraciones en el sistema endocannabinoide.

Los resultados han apoyado nuestra hipótesis inicial. Específicamente, planteábamos que el sistema endocannabinoide podía jugar un papel importante en la programación metabólica y conductual. Concretamente, en el presente trabajo hemos hallado que, tanto la dieta materna restringida como la dieta materna hipercalórica/altamente palatable, pueden inducir alteraciones metabólicas y conductuales en etapas posteriores de la vida, estando las mismas su vez asociadas a modificaciones en el sistema endocannabinoide desde etapas tempranas, pero también en etapas posteriores. Todos estos aspectos son compatibles con la hipótesis de la programación errónea en periodos críticos del desarrollo por los insultos nutricionales maternos, planteada previamente otros autores (Langley-Evans, 2013; Gluckman, Hanson, & Low, 2011; Muhlhausler & Ong, 2011; Plagemann, 2006; Tarry-Adkins & Ozanne, 2011; Barker, 2007; Lucas, 1991), en la cual el sistema endocannabinoide emerge como un nuevo mecanismo involucrado en el proceso.

Considerando los objetivos específicos planteados en la investigación, se irán destacando los hallazgos más significativos comparando los modelos de dieta materna estudiados.

# 1. LAS DIETAS MATERNAS INADECUADAS (DIETA RESTRINGIDA Y/O HIPERCALÓRICA) ALTERAN LA GESTACIÓN Y SUS PRODUCTOS PERINATALES

## 1.1 Afectación sutil de los parámetros de fertilidad tras la exposición a dietas maternas inadecuadas en el periodo preconcepcional: Posible impacto en la nutrición histiotrófica

En el presente estudio hemos implementado tres modelos de dieta materna inadecuada (R1, R2 y P). En dos de ellos, la dieta experimental fue asignada en el periodo pregestacional (R1 y P) y por tanto, se evaluó si la dieta podía afectar a parámetros relacionados con la fertilidad, de forma similar a como previamente ha sido constatado en mujeres con trastornos de la conducta alimentaria y mujeres con obesidad o sobrepeso (Micali et al., 2014; Freizinger, Franko, Dacey, Okun, & Domar, 2010; Pasquali, Pelusi, Genghini, Cacciari, & Gambineri, 2003; Zaadstra et al., 1993). Específicamente, en las ratas sometidas a dieta restringida moderada encontramos sutiles cambios en la fertilidad, que no llegaron a ser estadísticamente significativos (**artículo 2**). Por otra parte, en los animales con dieta de libre elección, constatamos mayor frecuencia de ciclos irregulares y/o prolongado diestro (**datos complementarios al artículo 5**). Sin embargo, estas alteraciones no impidieron que el 100% de los animales cruzados consiguiera la gestación.

A pesar de la ausencia de impacto en la fecundidad, el hecho de que los animales expuestos a dieta restringida desde el periodo preconcepcional presentaran un tamaño menor de la camada, nos sugiere que podrían haber experimentado un mayor número de pérdidas fetales en el periodo pre y postimplantacional (Terry et al., 2005). Estos hallazgos, que son a su vez compatibles con el mayor riesgo de aborto que presentan las mujeres con nutrición deficiente en el periodo preconcepcional y gestación temprana (Linna et al., 2013; Micali, Simonoff, & Treasure, 2007), podrían indicar que, pese a que las demandas energéticas durante las primeras fases de la gestación son escasas (FESNAD, 2010; Institute of

Medicine, 2005), la nutrición histiotrófica, dependiente de las glándulas uterinas (Burton et al., 2002), sí podría estar afectada. En apoyo de esta idea por ejemplo se sabe, que las concentraciones de glucógeno y proteínas en el citoplasma de las células endometriales va aumentando desde el periodo preovulatorio, especialmente desde que se presenta el pico en la secreción de LH y su secreción sigue manteniéndose por las glándulas uterinas en la gestación temprana (Burton et al., 2002). Estos aspectos plantean la posibilidad de que la secreción de estos nutrientes desde el periodo periovulatorio podría verse modificada en presencia de inadecuadas condiciones nutricionales y afectar así a la supervivencia y crecimiento de los embriones en el periodo postconcepcional. Congruente con esta idea, la ausencia o deficiencia de glándulas uterinas y específicamente las secreciones de las mismas ha demostrado afectar a la fertilidad y también a la supervivencia de los embriones o a su crecimiento (Gray et al., 2001; Gray et al., 2000). También, investigaciones recientes dentro del campo de las técnicas de reproducción asistida, muestran que el medio de cultivo de los embriones puede afectar a la mortalidad de los mismos (Serrano et al., 2014).

La inhibición de la nutrición histiotrófica por diferentes agentes farmacológicos, además de alterar el crecimiento de las crías, puede inducir también malformaciones que podrían provocar mortalidad aumentada en el periodo postnatal (Marshall et al., 2015). En nuestro estudio, en el modelo de dieta materna hipercalórica, a diferencia de lo encontrado en otros estudios con exposición a dieta de cafetería únicamente en el periodo gestacional (Ong & Muhlhausler, 2011; Bayol, Farrington, & Stickland, 2007;), encontramos una mayor mortalidad neonatal (**artículo 5**), hallando en una de las camadas crías con signos de malformaciones (datos no mostrados). Considerando que las madres fueron expuestas a esta dieta desde 8 semanas antes de la gestación y durante la gestación disminuyeron de forma voluntaria la ingestión de comida hipercalórica y altamente palatable (**artículo 5**), se plantea la posibilidad de que la exposición prolongada a una dieta inadecuada desde el periodo preconcepcional podría haber alterado la nutrición histiotrófica, impactando posteriormente en la vitalidad y salud a corto y largo plazo de las crías. Congruente con esta idea, se ha mostrado que el medio donde los embriones son cultivados puede resultar crítico para el desarrollo de síndrome metabólico y/o alteraciones conductuales en etapas posteriores de la vida (Serrano et al., 2014; Fernandez-Gonzalez et al., 2004).

En relación a estos resultados es interesante destacar que en los modelos R1 y P hallamos una disminución en la ingesta de proteínas maternas durante la gestación (**datos complementarios al artículo 2, supplementary figure 1, artículo 5**). Este aspecto

podría haber sido clave en los resultados exhibidos en la descendencia desde estadios iniciales, en especial considerando que la restricción proteica ha sido vinculada a alteraciones metabólicas y conductuales (Belluscio, Berardino, Ferroni, Ceruti, & Canepa, 2014; Reyes-Castro, Rodriguez, Charco et al., 2012; Reyes-Castro, Rodriguez, Rodriguez-Gonzalez et al., 2012; Reyes-Castro et al., 2011; Coupe, Grit, Darmaun, & Parnet, 2009; Langley-Evans & Nwagwu, 1998) Por otra parte, el tipo de grasas y azúcares, y en particular la elevada ingesta de grasas saturadas junto con el aumento en los azúcares del modelo de dieta hipercalórica (**figuras 13, 14 y 15**), podrían haber sido también factores explicativos en los resultados, tal y como ha sido apuntado en previos estudios (Liang, Oest, & Prater, 2009; Nivoit et al., 2009).

En conjunto estos aspectos destacan el impacto del periodo preconcepcional en los resultados de la descendencia a corto plazo, que a su vez podrían tener consecuencias en la salud en etapas posteriores de la vida.

## 1.2 Afectación de la ganancia de peso materna tras la exposición a dietas maternas inadecuadas

El estado nutricional materno suele evaluarse a través del peso ganado en la gestación (Scott et al., 2014; Institute of Medicine, 1990), por estar estrechamente relacionado con la ingesta energética y resultar de más fácil y rápida obtención. Se considera que una adecuada ganancia de peso materno durante la gestación es necesaria para la prevención de problemas de salud futuros tanto en los niños como en las madres (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013; Thorsdottir et al., 2002), y que dicha ganancia de peso debe tener en cuenta el índice de masa corporal pre-concepcional (Institute of Medicine, 2009).

Tanto la excesiva ganancia de peso durante la gestación como la deficiente ganancia de peso están asociadas a complicaciones maternas y fetales. En los países occidentales, donde la sobrenutrición es mucho más común, la mayoría de las mujeres ganan más peso del recomendable (Gould Rothberg et al., 2011; Crane et al., 2009), estando este aspecto relacionado con complicaciones maternas y fetales. Sin embargo, a nivel global sigue habiendo problemas de subnutrición, que podrían ir asociados a una disminución de la

ganancia ponderal durante la gestación (Simas et al., 2012; Onis, Ezzati, Mathers, & Rivera, 2008). Específicamente, en los países desarrollados la prevalencia de mujeres con trastornos de alimentación o con síntomas de trastornos alimentarios no es nada desdeñable (Easter et al., 2013). Ciertas conductas restrictivas durante la gestación podrían impedir una ganancia ponderal gestacional adecuada, acorde al peso pregestacional (Institute of Medicine, 2009; Micali, Treasure, & Simonoff, 2007; Treasure & Russell, 1988), e incrementar el riesgo de resultados obstétricos y/o neonatales adversos (Linna et al., 2014; Micali, Simonoff, & Treasure, 2007). Por tanto, parece necesario alcanzar una óptima ganancia de peso, que vaya en función del estado nutricional o peso pregestacional materno, para evitar complicaciones posteriores. Específicamente, resulta muy pertinente el estudio del impacto de estos indicadores en la salud en etapas posteriores de la vida, hasta ahora poco contemplado.

En nuestro estudio, y como era esperable, considerando el aporte energético aportado, las dietas maternas inadecuadas (dieta restringida e hipercalórica) modificaron la ingesta calórica y la ganancia de peso corporal de las madres durante el periodo preconcepcional y/o gestacional. Específicamente encontramos que la dieta materna restringida tipo 1 (R1) provocó menor ganancia de peso en las madres, durante los periodos en los que la misma se implementó (pregestación y gestación). También se produjo una menor ganancia de peso gestacional en la restricción tipo 2 (R2), la cual fue introducida durante toda la gestación. En este caso, considerando que los animales habían estado bien nutridos antes de la gestación, las diferencias en ganancia de peso fueron más evidentes a partir de la mitad de la gestación, que es cuando en general se observa una mayor ganancia de peso en los animales gestantes controles sometidos a dieta estándar *ad libitum*. En el caso de la dieta materna hipercalórica, constatamos como las madres exhibieron mayor ganancia de peso que los controles durante el periodo pregestacional. Sin embargo, y de forma sorprendente, no fue así durante la gestación, pese a que el aporte energético fue mayor también durante estos periodos. Este hallazgo llamativo podría haber estado vinculado a la menor ingesta de proteínas proporcionada la dieta de libre elección, como ya se ha discutido en el **artículo 5** y que ha sido a su vez asociado a menor peso al nacimiento de las crías (Gresham et al., 2014; Ong & Muhlhausler, 2011; Bayol et al., 2007). Por otra parte, también constatamos que durante la gestación las madres sometidas a la dieta hipercalórica de libre elección disminuyeron su preferencia por el chocolate (**figura 1, artículo 6**), lo que hizo que la ingesta calórica no aumentara tanto como había sucedido en el periodo pregestacional.



Estos aspectos, por tanto, podrían haber influido en la ausencia de diferencias en ganancia de peso durante el periodo gestacional en las ratas madres asignadas a la dieta hipercalórica altamente palatable.

La ausencia de cambios en la ganancia ponderal en las madres sometidas a dieta hipercalórica, a pesar de haber sido constatado en un modelo animal, resulta curioso, en especial considerando que el peso ganado durante la gestación es un parámetro ampliamente utilizado para comprobar el estado nutricional de la gestación humana, como se mencionaba previamente (Scott et al., 2014; Institute of Medicine, 2009). En nuestro estudio, la ausencia de cambios en la ganancia ponderal durante la gestación no previno que la descendencia presentara alteraciones a corto y largo plazo. Por tanto, este hallazgo hace reflexionar sobre la necesidad de emplear en humanos otros indicadores nutricionales alternativos para evaluar el estado nutricional materno y prevenir las complicaciones asociadas en la descendencia.

Tras el nacimiento de las crías, se continuó el seguimiento en los modelos de restricción calórica (R1) y dieta de libre elección (P) en las madres y/o crías. De esta manera, durante la lactancia, constatamos como las madres sometidas a restricción calórica hasta dos días antes del parto, como era esperable, lograron alcanzar el peso de los controles a expensas de una mayor ganancia de peso durante la lactancia, especialmente al principio y final de este periodo (**artículo 2**). Curiosamente, este efecto se asoció a una mayor ingesta calórica relativa únicamente durante los primeros días tras el parto pero no durante todo el periodo. Este hallazgo, que puede resultar sorprendente, podría obedecer a un fenómeno de adaptación metabólica tras un periodo de restricción calórica prolongada y que previamente ha sido constatado en humanos adultos en la etapa posterior a la subnutrición (Dulloo & Jacquet, 1998).

Por otra parte, las madres del modelo P, que continuaron expuestas a una dieta hipercalórica de libre elección durante el periodo de la lactancia, ganaron menos peso que las madres controles. Este aspecto llamativo no estuvo asociado a una menor ingesta calórica durante este periodo, con respecto a los controles, pero podría ser justificable por la menor ingesta de chocolate que presentaron estas madres tras el nacimiento de las crías (**artículo 6**). Además, supuso una tendencia distinta a lo ocurrido en los periodos anteriores, donde la ingesta calórica era mayor. De esta manera, los animales previamente sobrealimentados podrían haber presentado una menor ganancia de peso al normalizar su

ingesta calórica, aspecto que en cualquier caso no impidió que estas madres presentaran mayor adiposidad que los controles al destete. En relación al drástico cambio que presentaron estos animales en la preferencia por chocolate con respecto a otros periodos como el pregestacional, se podría argumentar que el mismo podría estar relacionado con el escaso aporte proteico de la mezcla de chocolates, tal y como se ha discutido en el **artículo 6**.

En conjunto estos aspectos muestran como las dietas maternas influyen en la ganancia ponderal de las madres e ingesta calórica durante el periodo perinatal, lo cual resulta de interés, dada la relación de estos parámetros el desarrollo de alteraciones metabólicas y conductuales de la descendencia en etapas posteriores.

### **1.3 Alteración de los resultados neonatales y/o supervivencia de las crías tras la exposición a dietas maternas inadecuadas.**

En relación a los resultados neonatales, en todos los modelos de dieta inadecuada hallamos alteraciones bien en el tamaño de la camada o en el peso de las crías al nacimiento.

De forma sorprendente encontramos que la dieta materna restringida implementada en el periodo pregestacional y hasta dos días antes del parto, no afectó al peso de las crías al nacimiento, aunque sí alteró ligeramente el tamaño de la camada como ya se comentó anteriormente. En relación a la ausencia de cambios en el peso al nacimiento, el hallazgo es compatible con los resultados mostrados por otras investigaciones en modelos animales (Palou, Priego, Sanchez, Palou, & Pico, 2010; Poore et al., 2010; Sebert et al., 2009) y en humanos (Grooten et al., 2014; Roseboom et al., 2006), que señalan que cuando la restricción calórica no afecta al final de la gestación, el peso al nacimiento puede no verse afectado. En nuestro estudio, es importante considerar, que como las ratas finalizaron la restricción calórica dos días antes del parto, los fetos de las mismas podrían haber experimentado un crecimiento intrauterino acelerado, como ya había sido señalado previamente (Baik et al., 2014).

Por otra parte, los resultados neonatales en el modelo de restricción tipo 1 (**artículo 2**) contrastan con los resultados neonatales encontrados en la restricción tipo 2 (**artículo 4**).

En este caso, poniendo en práctica el mismo tipo de restricción moderada, sí encontramos un menor peso de las crías al nacimiento, sin cambios en el tamaño de la camada. Como una posible explicación, la continuación de la restricción calórica hasta el final de la gestación podría no haber permitido que los animales pudieran nacer con un peso normal al nacimiento, tal y como ha sido descrito en otros estudios previamente (Lukaszewski et al., 2011; Theys et al., 2011; Breton et al., 2009; Desai, Gayle, Babu, & Ross, 2005; Yura et al., 2005; Jimenez-Chillaron et al., 2005; Vickers, Breier, Cutfield, Hofman, & Gluckman, 2000).

Por último, constatamos cómo las crías procedentes de madres asignadas a una dieta hipercalórica de libre elección nacieron paradójicamente con menor peso al nacimiento y con un tamaño de la camada normal. Estos resultados son compatibles con los previamente descritos tras la exposición perinatal a dietas del estilo de cafetería o dietas ricas en grasa (Ong & Muhlhausler, 2011; Howie, Sloboda, Kamal, & Vickers, 2009; Bayol et al., 2007; Langley-Evans, 1996; Guo & Jen, 1995), aunque también contrastan con otros hallazgos que han asociado la sobrenutrición y/o obesidad materna con macrosomía al nacimiento o mayor tamaño de la camada (Samuelsson et al., 2008; Holemans, Caluwaerts, Poston, & Van Assche, 2004). La disminución en la ingesta proteica durante la gestación que presentaron estos animales, tal y como ha sido apuntado previamente (Ong & Muhlhausler, 2011; Bayol et al., 2007;) y como ya se ha discutido en el **artículo 5**, podría ser un factor clave en estos resultados.

El desequilibrio entre el aporte energético y las proteínas ingeridas, junto con el exceso de grasas, a su vez ha sido vinculado a una mayor mortalidad (Guo & Jen, 1995; Richardson, Godwin, Wilkes, & Cannon, 1964), aspecto que también constatamos en los animales expuestos a dieta hipercalórica/altamente palatable (*supplementary figure 2, artículo 5*). En relación a este aspecto, y considerando que el sistema endocannabinoide está implicado en la supervivencia de las crías y en la conducta de succión de las mismas (Fride et al., 2003; Fride et al., 2001), no se puede descartar que el menor nivel de endocannabinoides presentes al nacimiento en los tejidos cerebrales analizados, y que presumiblemente continuó durante la lactancia, también pudiera haber jugado un papel importante en esa mortalidad incrementada.

Considerando la relación de estos parámetros con el desarrollo posterior de anomalías metabólicas y conductuales, como se analizará posteriormente, estos aspectos hacen

reflexionar sobre la importancia de indagar en la práctica clínica sobre aspectos nutricionales específicos durante los periodos críticos, que incluyan el periodo preconcepcional, además de monitorizar la ganancia de peso materna e identificar a los niños con sospechas de haber presentado una mala programación.

## **2. LA EXPOSICIÓN A DIETAS MATERNAS INADECUADAS (DIETA RESTRINGIDA Y/O HIPERCALÓRICA) ALTERA LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO Y METABÓLICOS DE LA DESCENDENCIA**

Los animales expuestos a las distintas dietas maternas inadecuadas en los que se realizó seguimiento hasta la edad adulta (modelos R1 y P) experimentaron diferentes patrones de crecimiento y anomalías metabólicas, que a su vez se asociaron a alteraciones en la expresión del ARNm de genes relacionados con el metabolismo. Estos hallazgos fueron además distintos en función del sexo.

En el caso de los animales expuestos a dieta restringida, los cuales habían nacido con normopeso al nacimiento, mantuvieron en general esa misma tendencia durante el periodo neonatal. Sin embargo, los machos sí exhibieron, durante algunos días de la lactancia, mayor peso corporal (**artículo 3**). En el periodo postdestete, los mismos empezaron a presentar sobrepeso desde el principio de la edad adulta (**artículo 3**), pese la ausencia de incremento en la ingesta calórica. Por tanto, es posible que estos animales pudieran haber presentado una disminución del gasto energético o una mayor eficiencia energética, de forma similar a lo previamente descrito (Theys et al., 2011; Sebert et al., 2009; Yura et al., 2005), siguiendo un patrón similar a lo mostrado por sus madres durante la lactancia. En relación a las hembras, no se detectaron cambios en los parámetros de crecimiento e ingesta calórica durante el periodo de estudio.

En el modelo de dieta materna hipercalórica, en el cual la dieta materna inadecuada continuó durante la totalidad del periodo de lactancia, se encontró que los animales de ambos sexos presentaron menor peso que los controles hasta el momento del destete.

Aunque las madres durante la lactancia prefirieron ingerir más la comida estándar y menos chocolate que en los otros periodos, aumentando de esta manera el aporte proteico, no se evitó que durante la lactancia la ingesta proteica materna siguiera siendo significativamente menor que la de los controles. Este aspecto podría explicar la baja ganancia ponderal de las crías durante este periodo (**figura 5, artículo 5**). Por otra parte, y teniendo en cuenta que las crías procedentes de las madres P en el momento del nacimiento mostraran bandas de leche menos pronunciadas, es posible que estas madres, con mayor adiposidad, presentaran también menor secreción láctea, como consecuencia de una menor respuesta a la prolactina, y/o retraso en la lactogénesis II, situaciones que han sido descritas en madres obesas (Rasmussen & Kjolhede, 2004). Estos aspectos unidos también una menor succión de las crías, presumiblemente por un descenso en los niveles de endocannabinoides (Fride et al., 2001), podría haber afectado al crecimiento de las mismas. Tras el destete, en este modelo de dieta materna hipercalórica/altamente palatable, encontramos dos perfiles de crecimiento distintos en machos y hembras. Por una parte los machos, que exhibieron hiperfagia durante la infancia, lograron alcanzar el peso de los controles en la etapa adolescente-adulta, mientras que las hembras, que exhibían hiperfagia, más tardíamente pero durante un periodo más prolongado, no lograron nunca alcanzar el peso de las hembras control (**artículo 6**).

En relación a los parámetros metabólicos en la descendencia de las madres expuestas a dieta restringida, se encontraron durante el periodo pregestacional y gestacional, importantes alteraciones metabólicas, siendo las mismas más acentuadas en el caso de los machos. Un aspecto altamente llamativo es que estas alteraciones se produjeron pese a que la dieta a la que fueron asignados postnatalmente fue una dieta normal, de forma similar a lo previamente documentado por otros autores en modelos animales de restricción calórica (García et al., 2011; Lukaszewski et al., 2011; Suzuki et al., 2010; Breton et al., 2009; Desai et al., 2005). Es interesante enfatizar la posibilidad de que estas crías podrían haber presentado un crecimiento compensador acelerado en el medio intrauterino, como se comentaba anteriormente. Este tipo de crecimiento ha sido señalado como muy deletéreo, en especial al compararlo con el crecimiento compensador lento (Jimenez-Chillaron et al., 2006; Desai et al., 2005). De esta manera, los machos procedentes de las madres R1 presentaban en la etapa adulta, además de sobrepeso, mayor adiposidad perirrenal, hiperleptinemia y alteraciones en el perfil lipídico. Las hembras, que mantuvieron normopeso durante todo el periodo, a su vez mostraban alteraciones en la glucemia y en el

perfil lipídico, aunque no así en la leptina y en la adiposidad (**artículo 3**).

En lo que respecta a la descendencia procedente de las madres P, las mismas también presentaron anormalidades metabólicas, siguiendo igualmente un perfil diferencial en función del sexo. De esta manera, los machos que habían presentado un crecimiento compensador lento y mostraban normopeso en la etapa adulta, presentaban al sacrificio mayor adiposidad abdominal, hiperleptinemia así como alteraciones en el perfil lipídico. Las hembras, que mostraban menor peso que los controles y por tanto, ausencia de crecimiento compensador, exhibían alteraciones en el perfil lipídico y adiposidad perigonadal aumentada. Por tanto, tanto machos como hembras presentaban características propias del síndrome metabólico (Alberti et al., 2009), pese a la ausencia de crecimiento compensador o la presencia crecimiento compensador lento en la descendencia. Este aspecto contrasta con el hecho de que este tipo de crecimiento ha sido considerado como menos lesivo para el desarrollo de anormalidades metabólicas en la descendencia con bajo peso al nacimiento (Coupe, Grit, Darmaun, & Parnet, 2009; Desai et al., 2005).

Es interesante destacar que en ambos modelos de dieta materna inadecuada se observaron alteraciones metabólicas sexualmente dimórficas, hallándose en general alteraciones metabólicas más acentuadas en los machos, los cuales presentaron, a diferencia de las hembras, incremento de la adiposidad y leptina, en ausencia de cambios en la ingesta calórica. Estos aspectos podrían indicar leptin-resistencia (Sasaki, 2015; Friedman & Halaas, 1998), lo cual es comparable a lo previamente descrito tras la exposición a dietas maternas hipo e hipercalóricas (Rolland-Cachera et al., 2013; Ong & Muhlhausler, 2011; Garcia et al., 2010; Chen et al., 2009; Kirk et al., 2009; Bayol et al., 2008; Singhal et al., 2002; Vickers, Breier, Cutfield, Hofman, & Gluckman, 2000). Además, las alteraciones en los machos se asociaron a su vez a alteraciones en la expresión de genes del sistema endocannabinoide y genes implicados en el metabolismo, principalmente en el tejido graso perirrenal.

En relación a las hembras, se encontraron, pese a la ausencia de sobrepeso, adiposidad o hiperleptinemia en ambos modelos, alteraciones en los metabolitos plasmáticos, principalmente en el perfil lipídico. La aparente menor afectación en las hembras, ha sido documentada en varios modelos de dieta materna hipo e hipercalórica (Dahlhoff et al., 2014; Palou et al., 2010; Desai, Babu, & Ross, 2007), habiéndose asociado a alteraciones en la metilación del DNA en la placenta tras la exposición a dietas maternas inadecuadas

(Gallou-Kabani et al., 2010). En lo que respecta a la ausencia de cambios en los niveles de leptina, la mayor sensibilidad a la leptina hipotalámica descrita en las hembras podría jugar un papel clave (Clegg, Riedy, Smith, Benoit, & Woods, 2003), al igual que los factores hormonales (Clegg, Brown, Woods, & Benoit, 2006). Sin embargo, también hallamos que las alteraciones metabólicas, especialmente en plasma, se acompañaron de alteraciones en la expresión de genes del sistema endocannabinoide y genes implicados en el metabolismo principalmente en el hígado, que en general eran más extensas que en el caso de los machos.

Adicionalmente, encontramos algunas diferencias entre los modelos. Así, constatamos que las alteraciones metabólicas en la descendencia R eran, en general, más robustas. De esta manera, en los machos R se halló una importante afectación del perfil lipídico (incremento altamente significativo en los niveles de triglicéridos y colesterol LDL, drástica reducción en el colesterol HDL y aumento en las concentraciones de VLDL). Estos aspectos podrían estar relacionados con varios factores entre los cuales podríamos mencionar el tipo de crecimiento compensador, que en el caso de los machos R presumiblemente fue un crecimiento intrauterino acelerado, como anteriormente se comentaba, la presencia de sobrepeso en los machos R, así como la afectación más extensiva e importante en el sistema endocannabinoide en los tejidos analizados, que más adelante se detalla, junto la afectación en la expresión de genes relacionados con el metabolismo, principalmente en la grasa perirrenal. Así, en los machos R se encontró en el tejido adiposo perirrenal una regulación a la baja de genes de enzimas implicadas en la beta oxidación (*Cpt1b* y *Acox1*) y en la cadena respiratoria mitocondrial (*Cox4it*), lo cual apoya la idea, anteriormente mencionada, de que estos animales podrían haber presentado una disminución del gasto energético. También, observamos una disminución en la expresión génica del factor de transcripción PPAR $\gamma$ , aspecto que es compatible con la aparición de características del síndrome metabólico asociadas a procesos inflamatorios (Reynolds, Li, Gray, & Vickers, 2014; Odegaard et al., 2007). En el caso de las hembras R, se hallaron alteraciones en la glucemia y en el perfil lipídico. Estas anomalías se asociaron a una disminución en la expresión hepática de los genes *Ppara* y *Ppar $\gamma$* , los cuales han sido implicados en el metabolismo de la glucosa y lípidos (Liu et al., 2015). Además, las anomalías en los lípidos plasmáticos de las hembras R, más drásticas que en las hembras P, se acompañaron de cambios en la expresión génica hepática. Específicamente se halló una regulación a la baja de la expresión los genes lipogénicos (*Acaca*, *Fasn*), de los implicados en la  $\beta$ -oxidación

(*Cpt1a* y *Acox1*) así como la reducción en la expresión de los genes reguladores de la síntesis de colesterol (*Insig1* y *Hmgcr*).

En el modelo de dieta materna hipercalórica encontramos curiosamente que, en ausencia de sobrepeso o incluso menor peso corporal, tanto la descendencia macho como la hembra mostraba mayor adiposidad que los controles, de forma similar a sus madres. En el caso de las hembras P, la mayor adiposidad perigonadal, iba asociada a sobreexpresión del receptor cannabinoide tipo 1, en el tejido graso perirrenal, como más adelante se detalla, siendo este dato coherente con lo previamente descrito tras la ingestión de comidas ricas en grasas (Vida et al., 2014). En el caso de los machos P, que exhibían gran adiposidad abdominal relativa al peso corporal, las alteraciones en el perfil lipídico se restringían principalmente al colesterol HDL y LDL. Estas anomalías metabólicas se asociaron a su vez con disminución en la expresión del factor *Pparγ* en hígado y con la mayor expresión génica de la enzima lipogénica *Acaca* en el tejido adiposo perirrenal, alteraciones que fácilmente podrían explicar las anomalías fenotípicas descritas anteriormente.

Es importante señalar que todos los anteriores aspectos metabólicos se encontraron en presencia de una dieta normal desde el momento del destete, dieta que por otra parte fue distinta a la que los animales habían estado expuestos en el periodo perinatal. Estos aspectos ensalzan el papel de las condiciones nutricionales en momentos críticos del desarrollo, pero además, merece la pena señalar la compatibilidad de estos datos con la hipótesis de la respuesta predictiva adaptativa propuesta por Gluckman & Hanson (2004). De acuerdo a la misma, los fetos ponen en marcha mecanismos de adaptación ante una nutrición inadecuada durante la vida intrauterina, por lo que la presencia de un ambiente postnatal completamente distinto al ambiente al cual ya estaban adaptados, podría favorecer el desarrollo de anomalías metabólicas en estadios posteriores (Gluckman & Hanson, 2004; Hales & Barker, 2001).



### **3. LA EXPOSICIÓN A DIETAS MATERNAS INADECUADAS (DIETA RESTRINGIDA Y/O HIPERCALÓRICA) INCREMENTA EL RIESGO DE DESARROLLAR CONDUCTAS ALTERADAS EN LA DESCENDENCIA**

La hipótesis de programación del metabolismo, ha sido ampliamente apoyada por numerosas investigaciones llevadas a cabo en humanos y en modelos animales (Catalano et al., 2009; Chen et al., 2009; Bayol et al., 2008; Barker, 2007; Barker, 2006; Eriksson, Osmond, Kajantie, Forsen, & Barker, 2006; Roseboom et al., 2006; Boney, Verma, Tucker, & Vohr, 2005; Desai et al., 2005; Plageman, 2005; Vickers et al., 2000; Ravelli et al., 1999). Adicionalmente, diferentes estudios han hallado evidencias de que tras la exposición a dietas maternas inadecuadas durante los periodos críticos del desarrollo podría producirse una programación conductual (Akitake et al., 2015; Sullivan et al., 2014; Bolton & Bilbo, 2014; Sasaki, de Vega, St Cyr, Pan, & McGowan, 2013; Peleg-Raibstein, Luca, & Wolfrum, 2012; Ong & Muhlhausler, 2011; Bayol et al., 2008; Lussana et al., 2008). Este hecho no resulta del todo extraño, si se tiene en cuenta que los importantes procesos que se producen durante el desarrollo cerebral y están relacionados con determinadas conductas, son altamente dependientes del estado nutricional (Keimpema et al., 2013; Georgieff, 2007; Walker, 2005; Morgane, Mokler, & Galler, 2002) .

En nuestro estudio evaluamos el impacto de las dietas maternas restringidas e hipercalóricas en algunas respuestas conductuales en la adolescencia y/o etapa adulta. Principalmente hallamos alteraciones en las conductas relacionadas con la ansiedad e ingesta, incluyendo la preferencia por determinados alimentos. Además, encontramos, en algunas de estas alteraciones, un patrón diferencial según el sexo y el tipo de modelo de dieta materna inadecuada implementado. En general, observamos alteraciones conductuales más pronunciadas en los machos y también en el modelo de dieta materna hipercalórica/altamente palatable. En conjunto, estos datos apoyan la idea de que en los periodos críticos se puede producir una programación conductual.

### **3.1 La exposición a dietas maternas inadecuadas (dieta restringida y/o hipercalórica) se asocia a un fenotipo ansioso en etapas posteriores de la vida**

En lo que respecta al modelo de dieta materna restringida, constatamos un aumento sutil en las respuestas relacionadas con la ansiedad, principalmente en el laberinto en cruz elevado y en la descendencia macho. Estos hallazgos son compatibles con investigaciones previas realizadas en humanos que presentaron bajo peso al nacimiento y en modelos animales de restricción calórica, especialmente cuando la misma incluye la primera parte de la gestación (Levay et al., 2010; Levay et al., 2008; Nomura et al., 2007; Erhard, Boissy, Rae, & Rhind, 2004; Hack et al., 2004).

En el caso de la exposición a dieta hipercalórica/altamente palatable encontramos mayor frecuencia de respuestas relacionadas con la ansiedad en la descendencia macho, tanto en el laberinto en cruz elevado como en el test de campo abierto. También estos datos son asimilables a estudios anteriores que muestran que la exposición a dietas ricas en grasas y/o altamente palatables se asocia a un aumento en las respuestas relacionadas con la ansiedad (Sasaki et al., 2013; Peleg-Raibstein et al., 2012; Sullivan et al., 2010).

En relación a la comparativa entre los modelos observamos que en la descendencia macho de ambos modelos presentaba mayor frecuencia de respuestas relacionadas con la ansiedad que la descendencia hembra. Aunque este aspecto diferencial entre ambos sexos no ha sido considerado de forma sistemática en los estudios dirigidos a evaluar el impacto en las respuestas relacionadas con la ansiedad tras la exposición a condiciones nutricionales inadecuadas (Peleg-Raibstein et al., 2012; Levay et al., 2008), sí es compatible con otros hallazgos que han mostrado una menor afectación de la descendencia hembra (Wright, Langley-Evans, & Voigt, 2011; Bilbo & Tsang, 2010). No obstante, también se ha documentado lo contrario, encontrándose que las hembras expuestas perinatalmente a dietas ricas en grasas o deficientes en proteínas muestran mayor propensión a padecer respuestas relacionadas con la ansiedad (Sasaki et al., 2013; Reyes-Castro, Rodriguez, Charco et al., 2012; Reyes-Castro, Rodriguez, Rodriguez-Gonzalez et al., 2012; Sullivan et al., 2010). Posiblemente factores metodológicos como la composición específica de las dietas y momento en el que se implementa la misma (Sullivan et al., 2014; Alamy & Bengelloun, 2012), condiciones de iluminación empleadas en los test para evaluar las

respuestas (Walf & Frye, 2007) así como la influencia del ciclo estral (Marcondes, Miguel, Melo, & Spadari-Bratfisch, 2001) podrían explicar las diferencias entre estudios.

Por otra parte, siguiendo con la comparación entre modelos, también hallamos que en el modelo de dieta materna hipercalórica/altamente palatable, el número de conductas relacionadas con la ansiedad era muy superior a las exhibidas por los animales expuestos a una dieta restringida. Como posible explicación podría tenerse en cuenta el déficit de proteínas. De esta manera, aunque en ambos modelos se constató una disminución de la ingesta proteica materna durante la gestación (*figura complementaria 1, supplementary figure 1 artículo 5*), al comparar el consumo total de proteínas entre ambos modelos durante la gestación encontramos que los animales expuestos a una dieta hipercalórica/altamente palatable consumieron paradójicamente menos proteínas que los expuestos a dieta restringida durante el mismo periodo ( $t=11.66$ ,  $p<0.001$ , datos no mostrados). En ese sentido, la malnutrición proteica ha sido asociada a afectación de la formación del hipocampo y a alteraciones en la secreción del GABA (Chang, Galler, & Luebke, 2003). Las alteraciones en este sistema de neurotransmisión a su vez han sido vinculadas a una mayor vulnerabilidad para el desarrollo de respuestas relacionadas con la ansiedad (Peleg-Raibstein et al., 2012), lo cual podría subyacer al fenotipo ansioso exhibido por los animales P. Teniendo en cuenta que el sistema endocannabinoide y el sistema gabaérgico están estrechamente relacionados, en especial en el hipocampo, donde la activación de los receptores CB1 presinápticos disminuyen la secreción del GABA (Katona et al., 1999), y observando la afectación diferencial de las endocannabinoides y/o lípidos relacionados en el hipocampo en los animales expuestos a la dieta hipercalórica, como más adelante se comenta, es posible que el desarrollo de esta estructura se hubiera alterado dando así cuenta de las respuestas ansiosas exhibidas por la descendencia en etapas posteriores. De esta manera, en la actualidad estamos estudiando los efectos de este régimen dietético perinatal en la expresión de factores ansiolíticos (i.e. Neuropéptido Y) y ansiogénicos (i.e. CRH) en el hipotálamo y la amígdala de estos animales que muestran un perfil conductual de ansiedad.

### **3.2 La exposición a dietas maternas inadecuadas (dieta restringida y/o hipercalórica) altera la conducta de la ingesta de la descendencia**

En ambos modelos encontramos también alteraciones en la conducta de la ingesta, siendo igualmente en este caso más acentuadas para la descendencia expuesta a la dieta materna hipercalórica, mientras que las alteraciones observadas en el modelo de restricción fueron más sutiles.

En el caso de la descendencia macho expuesta a dieta restringida sólo encontramos pequeñas diferencias en los test de ingesta realizados, y básicamente ceñidas al test de AM251, en general no hallándose diferencias en lo que respecta a la preferencia por una comida hipercalórica/altamente palatable (**artículo 3**). Estos resultados contrastan con los encontrados en investigaciones previas, que muestran que tanto la dieta restringida durante la gestación como el crecimiento intrauterino restringido, propician una mayor preferencia por comidas ricas en grasa y/o azúcares en etapas posteriores de la vida (Palou et al., 2010; Barbieri et al., 2009; Lussana et al., 2008; Bellinger, Lilley, & Langley-Evans, 2004). En relación a estas discrepancias, conviene resaltar las diferencias metodológicas con algunos de estos estudios, especialmente las diferencias entre los test empleados para evaluar las respuestas (Palou et al., 2010; Bellinger & Langley-Evans, 2005). Sin embargo, observamos que las hembras presentaban menor preferencia por el chocolate en el test de ingesta compulsiva en la adolescencia, confirmándose la misma tendencia al evaluarse la ingesta diferencial tras la administración de AM251 en la etapa adulta (**artículo 3**).

La menor preferencia por el chocolate exhibida por las hembras R, podría estar relacionado con la hiperglucemia que las mismas presentaban, previamente comentada. Así, los elevados valores de glucemia plasmática podrían haber disminuido la actividad de las neuronas sensibles a la glucosa, en un intento de mantener las cifras de glucosa en un rango óptimo (Routh, Hao, Santiago, Sheng, & Zhou, 2014). Por otra parte, estos resultados son coherentes con los de datos procedentes de modelos animales expuestos perinatalmente a restricción proteica. En ese sentido se ha mostrado cómo la descendencia hembra, y no la descendencia macho, expuesta a restricción proteica en la primera parte de la gestación, a diferencia de lo que ocurre cuando la restricción se implementa en otros periodos, muestra menor preferencia por comidas ricas en grasa (Bellinger & Langley-Evans, 2005) (**artículo**

3). Aunque en nuestro caso, se implementó una restricción calórica global, sí observamos que las madres expuestas a la restricción calórica ingirieron igualmente menos proteínas durante toda la gestación (*figura complementaria 1*), siendo por tanto esa idea coherente con nuestros datos.

En lo que respecta a la descendencia expuesta a dieta materna hipercalórica/altamente palatable encontramos mayores diferencias. Específicamente, constatamos que en el test de ingesta compulsiva estos animales mostraban significativamente menor preferencia por el chocolate en los dos periodos en que el test se realizó, siendo la respuesta igual para ambos sexos al ser comparados con sus respectivos controles (**artículo 6**). Este aspecto que podría indicar una hipofunción en el sistema de recompensa, previamente documentada tras la exposición prolongada a dietas hipercalóricas (Rabasa et al., 2016; Vucetic, Kimmel, & Reyes, 2011), contrasta con otras investigaciones que han encontrado elevada preferencia por comidas altamente palatables tras la exposición a dietas maternas hipercalóricas y/o “comida basura” (Ong & Muhlhausler, 2011; Vucetic et al., 2010; Bayol et al., 2007). Curiosamente, en estas investigaciones, las madres elegían activamente la comida altamente palatable durante la gestación (Bayol et al., 2007) o ingerían grandes cantidades de grasa y/o azúcares durante la misma (Ong & Muhlhausler, 2011; Vucetic et al., 2010). En cambio, en nuestro estudio las madres cambiaron sus preferencias alimentarias durante el embarazo, como anteriormente se documentaba, lo que plantea si las preferencias maternas, la cantidad de grasa/azúcares ingeridos durante la gestación o ambos factores son elementos críticos para programar la preferencia por comidas altamente palatables en la descendencia (**artículo 6**).

La tendencia a menor preferencia por el chocolate, aunque en diferente grado pero constatada en ambos modelos, plantea la posibilidad de que el fenotipo ansioso de estos animales pudiera haber afectado a las preferencias, en especial porque los test fueron evaluados en circunstancias diferentes a las habituales y los mismos fueron realizados durante un corto periodo de tiempo. De esta manera, estudios previos han mostrado que la exposición a estímulos novedosos, como puede ser la presencia de una nueva dieta en condiciones ambientales distintas, favorece la aparición de respuestas neofóbicas en animales ansiosos (Peleg-Raibstein et al., 2012). También el déficit de proteínas al que estuvo expuesta la descendencia de ambos modelos, previamente comentado, podría ir asociada a la menor preferencia por la comida altamente palatable, que además era hipoproteica. Congruentemente, investigaciones previas han mostrado que los animales

expuestos a dieta hipoproteica desde etapas tempranas de la vida, desarrollan posteriormente preferencias por comidas ricas en proteínas, además de respuestas neofóbicas (Pettus, Geist, & Schultz, 1974; Peregoy, Zimmermann, & Strobel, 1972).

Adicionalmente, las alteraciones en el sistema endocannabinoide podrían explicar algunas de las diferencias encontradas en los test de ingesta en ambos modelos. Esta idea se sostiene en los conocimientos actuales que muestran que el sistema endocannabinoide está involucrado la percepción del sabor dulce y palatabilidad, además de en la regulación de la ingesta y equilibrio energético (Niki et al., 2015; Cristino et al., 2014; Alen, Ramirez-Lopez et al., 2013; DiPatrizio & Simansky, 2008). Además, se han encontrado diferentes patrones en la expresión de receptores cannabinoides en regiones cerebrales específicas, especialmente en las involucradas en el procesamiento de la recompensa, en función de las preferencias por comidas altamente palatables y/o exposición a las mismas (Bello et al., 2012; Brand, Spanagel, & Schneider, 2012; Harrold et al., 2002). Teniendo en cuenta estos aspectos y coherentemente, encontramos en ambos modelos alteraciones en la conducta de la ingesta tras la administración del AM251, las cuales fueron principalmente exhibidas por la descendencia macho. El AM251 es un ligando antagonista/agonista inverso de los receptores cannabinoides que ha mostrado disminuir la ingesta, especialmente de comidas altamente palatables, cuando se da la opción de elegir en un test (Droste, Saland, Schlitter, & Rodefer, 2010; Mathes, Ferrara, & Rowland, 2008). Particularmente, encontramos en los animales expuestos perinatalmente a restricción calórica que el AM251 disminuía la ingesta total energética sin ser capaz de disminuir la ingesta del chocolate, como sí ocurría en los controles (**artículo 3**). Por otra parte, en los animales macho expuestos a dieta hipercalórica/altamente palatable, encontramos también que el AM251 provocaba un descenso en la ingesta total pero, de forma distinta a los animales controles, reducía la ingesta de comida estándar, sin ejercer ningún efecto en la ingesta del chocolate (**artículo 6**). La respuesta diferencial ante el AM251 así como la posible disminución en la sensibilidad a la recompensa, más evidente en los machos P, podrían indicar un diferente patrón en la distribución de los receptores cannabinoides en regiones relacionadas con el sistema de recompensa (Brand et al., 2012). Teniendo en consideración la regulación a la baja de endocannabinoides hipotalámicos e hipocampales que presentaban estas crías al nacimiento y que a continuación se comentan, no es descartable que el establecimiento de conexiones con otras regiones cerebrales, incluyendo sistema de recompensa, así como la expresión de receptores cannabinoides se pudieran haber afectado desde etapas tempranas,

dando así cuenta de estas alteraciones en la respuesta al antagonismo canabinicoide (Keimpema et al., 2013; Berghuis et al., 2007). Con respecto a la ausencia de efectos en las hembras, pese a que en las hembras P encontramos una tendencia similar a la descrita en los machos, es posible que las variables hormonales pudieran haber afectado a los resultados, de forma similar a como ha sido apuntado por algunos autores (Primeaux, 2011; Rodríguez de Fonseca, Cebeira, Ramos, Martín, & Fernández-Ruiz, 1994).

## **4. AFECTACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN DIFERENTES MOMENTOS DEL CICLO VITAL EN LA DESCENDENCIA SOMETIDA A DIFERENTES DIETAS MATERNAS**

La principal hipótesis que se planteaba en esta investigación sostenía que el sistema endocannabinoide podía estar involucrado en el fenómeno de programación. Estudiar su papel en este proceso, parecía altamente pertinente, dadas las importantes relaciones que este sistema mantiene con otros mecanismos biológicos con un papel más establecido dentro de la programación (Keimpema et al., 2014; Bellocchio et al., 2013; Cota et al., 2006; Di Marzo et al., 2001). Para contrastar esta hipótesis evaluamos por primera vez, el estado del sistema endocannabinoide en la descendencia sometida a dietas maternas inadecuadas en dos momentos del ciclo vital: Al nacimiento, cuantificando los niveles cerebrales de endocannabinoides en las crías machos procedentes de las condiciones P y R1 y de las crías macho y hembra de las madres R2; y posteriormente, en la etapa adulta, evaluando la expresión génica de diferentes componentes del sistema endocannabinoide en hipotálamo, hígado y grasa de la descendencia de ambos sexos de las condiciones P y R1.

Específicamente, planteábamos que la señalización endocannabinoide podría verse afectada tras la exposición a dietas perinatales hipocalóricas y/o hipercalóricas/altamente palatables desde etapas tempranas. Aunque en nuestro estudio no examinamos con profundidad toda la vía de señalización endocannabinoide, nuestros resultados sí apoyaron esa idea. Así, en todos los modelos de dieta materna inadecuada implementados, mostramos por primera vez, alteraciones de los niveles de endocannabinoides y lípidos relacionados en el cerebro

de las crías recién nacidas, que bien podrían haber ido asociadas a modificaciones en la vía de señalización completa, dada la coordinación existente entre la síntesis de endocannabinoides y la expresión de sus receptores (Berghuis et al., 2007).

El hecho de que los niveles de endocannabinoides y/o lípidos cerebrales al nacimiento se hubieran modificado por la exposición a una dieta materna resulta de gran interés. Por una parte, ésta es la primera investigación que vincula la exposición a dietas maternas inadecuadas con alteración en los niveles de endocannabinoides al nacimiento. El resultado no es sorprendente, en especial al considerar que el perfil de ácidos grasos de la dieta puede modificar las concentraciones de los ácidos grasos precursores de endocannabinoides (como lo son el ácido araquidónico y el ácido linoléico) y/o NAEs, impactando así en los niveles de endocannabinoides y lípidos relacionados en diferentes tejidos (Alvheim et al., 2014; Artmann et al., 2008). Aunque algunos autores han documentado que los niveles de ácido araquidónico cerebral son más resistentes a la dieta en el cerebro adulto (Alvheim et al., 2014; Wood et al., 2010; Artmann et al., 2008) se han descrito alteraciones importantes en endocannabinoides o en los niveles de ácidos grasos tras manipulaciones dietéticas en animales con el cerebro en desarrollo, de forma similar a lo mostrado en nuestro estudio (D'Asti et al., 2010; Albuquerque et al., 2006; Matias et al., 2003; Berger et al., 2001). Considerando el importante papel que el sistema endocannabinoide presenta en el neurodesarrollo (Maccarrone et al., 2014; Keimpema et al., 2013; Keimpema, Mackie, & Harkany, 2011; Harkany et al., 2008), la modificación de los niveles de endocannabinoides y/o lípidos relacionados podría haber sido crítica para el desarrollo de las anomalías metabólicas y conductuales anteriormente comentadas.

Nuestros datos también apoyan otra de nuestras hipótesis, en la cual proponíamos que la alteración de la señalización endocannabinoide, tras la exposición a dietas maternas inadecuadas en etapas tempranas, podía afectar al desarrollo de circuitos implicados en el metabolismo y regulación emocional, incrementando así el riesgo de desarrollar alteraciones metabólicas y conductuales en el futuro. Esta propuesta toma como base por una parte, la hipótesis *“direct/double hit”*, que plantea que los estímulos maternos inadecuados pueden modificar la conectividad sináptica en el feto de forma directa o indirecta, favoreciendo el desarrollo de alteraciones en etapas posteriores de la vida. En segundo lugar, la idea tiene en cuenta que la conectividad sináptica es un proceso cerebral altamente relacionado con la señalización endocannabinoide (Keimpema et al., 2013; Berghuis et al., 2007), y por tanto, que una inadecuada señalización endocannabinoide podría propiciar alteraciones en el



desarrollo cerebral, favoreciendo el desarrollo de anomalías posteriormente. Así ha sido demostrado por investigaciones previas que han documentado, tras la exposición perinatal a derivados del cannabis o a compuestos agonistas/antagonistas de los receptores cannabinoides, la aparición de alteraciones en la actividad neuronal y/o conectividad cortical y el desarrollo de manifestaciones conductuales inmediatas o tardías (de Salas-Quiroga et al., 2015; Antonelli et al., 2005; Bernard et al., 2005; Moreno et al., 2005; Navarro et al., 1995; Rubio et al., 1995; Rubio et al., 1998). Por último, la hipótesis tiene en cuenta las evidencias que muestran que las condiciones nutricionales inadecuadas se asocian con alteraciones en el desarrollo de los circuitos hipotalámicos e hipocampales, específicamente mostrando anormalidades de leptina, y BDNF (Madore et al., 2014; Coupe et al., 2010; Coupe et al., 2009; Delahaye et al., 2008), que son proteínas altamente relacionadas con el sistema endocannabinoide (Keimpema et al., 2014; Di Marzo et al., 2001). Por tanto, es posible que la alteración en los niveles cerebrales de endocannabinoides en las crías, tras la exposición a dietas maternas inadecuadas, pudiera haber alterado procesos importantes cerebrales favoreciendo así la aparición de alteraciones metabólicas y conductuales en etapas posteriores de la vida, incluyendo entre las mismas a la afectación persistente del sistema endocannabinoide.

#### **4.1 La exposición a dietas maternas inadecuadas (dieta restringida y/o hipercalórica) altera los niveles de endocannabinoides y/o lípidos relacionados cerebrales en la descendencia al nacimiento**

En nuestro estudio, encontramos que, en las crías cuyas madres habían estado expuestas a las dietas hipo/hipercalóricas, los niveles de endocannabinoides y/o lípidos relacionados, estaban en general disminuidos en el hipotálamo en todos los modelos al nacimiento. En el hipocampo y bulbo olfatorio, aunque se halló en general una tendencia a la baja del tono cannabinoide, se encontraron más discrepancias entre los modelos. A continuación se detallan.

Con respecto al hipotálamo, se encontró en las crías procedentes de las madres R1 y P una afectación similar con reducción del AA, AEA, 2-AG y PEA, aunque el descenso fue mucho más drástico en la descendencia R1. Los resultados en la descendencia R2,

expuestas a la dieta restringida sólo durante la gestación, mostraron alteraciones sexo-dependientes, hallándose en los machos reducción del AA y de la OEA, y en el caso de las hembras disminución en el 2-AG y PEA.

La reducción en las concentraciones de ácido araquidónico que fue, a excepción de las hembras R2, un aspecto común en todos los modelos, puede explicarse en parte por la dependencia que guarda este PUFA (ácido graso poliinsaturado) con la dieta, bien de su ingesta directa o de la ingesta de su precursor, el ácido linoléico (Hansen & Artmann, 2008). Durante la gestación, ambos tipos de ácidos grasos se transfieren al feto a través de la placenta, dado que el feto requiere de altas concentraciones de los mismos para su correcto desarrollo y además, no es capaz de sintetizar completamente los ácidos grasos de cadena larga (PUFAs), dependiendo para ello de la madre (Amusquivar & Herrera, 2003; Herrera, 2002). Por tanto, la restricción calórica impuesta en las madres R1 y R2, podría haber alterado los niveles de ácido linoléico y/o AA maternos, impactando consecuentemente en los niveles fetales de los mismos. Por otra parte, el tipo de grasa de la dieta puede afectar a los niveles de ácido araquidónico. Por ejemplo, una elevada cantidad de grasa saturada en la dieta puede disminuir los niveles de ácido araquidónico (Garg, Thomson, & Clandinin, 1990), al igual que las grasas hidrogenadas enriquecidas en ácidos grasos trans (Albuquerque et al., 2006). Este aspecto podría explicar el hecho de que los animales expuestos a una dieta hipercalórica, a expensas de un elevado porcentaje de grasas saturadas, presentaran menores niveles del precursor de los endocannabinoides.

Considerando que los endocannabinoides se sintetizan a partir de fosfolípidos que contienen AA (Naughton et al., 2013), la reducción en los endocannabinoides en los machos R1 y P parece una consecuencia lógica de la alteración del AA (Berger et al., 2001; Hansen & Artmann, 2008). En el presente estudio, en general y salvo en el modelo R2, en el hipotálamo observamos una relación positiva entre los niveles de AA con los niveles de endocannabinoides. Por ejemplo, en el caso de la descendencia R1, que presentó una importante reducción en el AA, se encontró también una disminución muy importante de los niveles de endocannabinoides hipotalámicos. En el caso de la descendencia P, con afectación significativa en el AA, se encontró similarmente una reducción de AEA y 2-AG, aunque no tan drástica como en el caso del modelo R1.

Los resultados en los descendientes R1, contrastan con los encontrados en la descendencia R2, donde no hallamos alteraciones en los endocannabinoides hipotalámicos en los

machos, pese a que los mismos estuvieron expuestos al mismo tipo de restricción moderada. A diferencia del modelo R1, en este caso la restricción estuvo implementada durante la totalidad de la gestación, lo cual podría haber tenido algún impacto en los resultados. Así, la mayor afectación hipotalámica en la descendencia R1 podría apoyar la idea de que se produce una mayor alteración del sistema tras la reducción de las reservas maternas a consecuencia de la exposición a la restricción calórica implementada desde el periodo preconcepcional. En apoyo a esta idea, específicamente se sabe que el contenido de los ácidos grasos fetales al final de la gestación depende más de las reservas maternas, que se forman al principio de la gestación, que del aporte específico, al final de la gestación (Fernandes, Tavares do Carmo, & Herrera, 2012). Por tanto, la disminución en las reservas maternas en estos animales, consecutiva a una restricción calórica y evidenciada por el hecho de que las madres presentaron una menor ganancia ponderal durante toda la gestación, a diferencia de lo ocurrido en el modelo R2, podría haber favorecido una importante disminución del aporte de ácidos grasos y posiblemente de endocannabinoides al feto. Esta drástica reducción de endocannabinoides hallada en el modelo R1, podría haber impactado en la mayor afectación metabólica de los descendientes, siendo esta idea además coherente con los hallazgos de investigaciones previas, que muestran que la desnutrición en el periodo periconcepcional provoca efectos más nocivos en la descendencia (Zhang et al., 2013; McMillen et al., 2008; Roseboom et al., 2006). Por otra parte, en el descenso de endocannabinoides constatado en los modelos P y R1, no puede descartarse su asociación con la afectación de las enzimas de síntesis o degradación de los endocannabinoides, que hubieran favorecido o contribuido al descenso de los mismos. Las enzimas tienen una naturaleza proteica y curiosamente ambos modelos cursaron con un déficit de proteínas durante la gestación (*figura complementaria 1, supplementary figure 1, artículo 5*).

Resultó sorprendente el hecho de que la descendencia R2 macho, con reducción en los niveles de AA hipotalámicos, no presentara alteraciones en los niveles de endocannabinoides y que en cambio, la descendencia R2 hembra, sí mostrara reducción de los niveles de 2-AG en ausencia de cambios en el AA. A este respecto pueden plantearse varias posibilidades, que se han descrito en el **artículo 4**. En primer lugar, es posible que las enzimas responsables de la síntesis/degradación de los endocannabinoides pudieran haber estado afectadas, favoreciendo en el caso de los machos una mayor síntesis de endocannabinoides, a expensas de reducir los niveles de AA, y en el caso de las hembras

una mayor conversión de 2-AG a AA, quizás en un intento de mantener la homeostasis y preservar el desarrollo del cerebro, dadas las importantes funciones que los endocannabinoides y AA tienen en el mismo (Hadley, Ryan, Forsyth, Gautier, & Salem, 2016; Maccarrone et al., 2014; Keimpema et al., 2013; Gomez et al., 2008; Harkany et al., 2007). También es posible que el transporte placentario de AA y/o endocannabinoides hubiera sido diferente en machos y hembras, dando cuenta así de las alteraciones sexo-dependientes (Keimpema et al., 2013; Gabory et al., 2012; Gallou-Kabani et al., 2010).

Con respecto a la relación entre los niveles de endocannabinoides maternos y fetales, la misma ha sido poco estudiada, pese a que se sabe que la placenta tiene receptores endocannabinoides y tendría el potencial de transferirlos a la circulación fetal (Keimpema, et al., 2013). Esta idea resulta muy interesante también para explicar la drástica reducción de endocannabinoides encontrada en la descendencia R1, previamente comentada. Aquí, la reducción de endocannabinoides maternos resultó una situación altamente probable, teniendo en cuenta la prolongada exposición a la dieta restringida en las madres que, pese a haber recibido comida *ad libitum* dos días antes del parto, en el momento del parto aún no habían recuperado completamente su peso corporal (**artículo 2**). Similarmente, las dietas restringidas en roedores durante al menos 2 semanas se han asociado a una disminución de los endocannabinoides hipotalámicos (Hanus et al., 2003), lo que apoya esta posibilidad. También, la transferencia de endocannabinoides maternos al feto podría explicar la falta de correlación entre el peso corporal de las crías y los endocannabinoides hipotalámicos, situación que resultó discrepante con el estudio de Matías et al. (2003).

El estudio pionero de Matías et al. (2003), mostró por primera vez que la dieta materna restringida desde el final de la gestación y/o durante la lactancia se asociaba a un descenso en los endocannabinoides en las crías macho en el momento del destete. En este estudio, la reducción de endocannabinoides, particularmente de la AEA, se relacionaba con una disminución del peso corporal de las crías. La comparación de los resultados de nuestra investigación se hace necesaria con este estudio. En el modelo P encontramos una asociación similar a la encontrada en el estudio de Matías et al. (2003), encontrándose menor peso al nacimiento junto con descenso de los niveles de endocannabinoides, que bien podría explicarse por el déficit proteico en estos animales. Sin embargo, en el modelo R1, encontramos una reducción de los endocannabinoides tras la exposición a restricción materna, pero con ausencia de bajo peso al nacimiento, mientras que en el modelo R2 hallamos en los machos con exposición a restricción calórica también bajo peso al

nacimiento. pero en este caso en ausencia de cambios en los endocannabinoides. En general las divergencias entre los modelos R1 y R2 con este estudio podrían explicarse por el momento en que se midieron los endocannabinoides. En el estudio de Matías, que fueron evaluados al destete, los animales ya eran independientes del aporte materno, pudiendo por tanto reflejar los endocannabinoides su propio estado metabólico. Eso apoyaría la relación entre el bajo peso de los animales con el descenso hipotalámico de AEA, aspecto que fácilmente podría haber ido vinculado a una disminución del apetito (Jamshidi & Taylor, 2001; C. M. Williams & Kirkham, 1999). Sin embargo, en los modelos R1 y R2 implementados en nuestro estudio, con medición de endocannabinoides al nacimiento y por consiguiente mayor dependencia de la madre, los resultados podrían estar afectados por el estado de las reservas maternas y por tanto de endocannabinoides maternos, en especial considerando la estrecha relación entre la adiposidad y los niveles endocannabinoides plasmáticos que ha sido previamente estudiada (Blüher et al., 2006).

En relación a las NAEs, tanto en el modelo R1, como en el modelo P y en las hembras R2, se observó una disminución significativa de los niveles de la PEA en el hipotálamo. Con respecto a la posible relación con los efectos metabólicos observados en la descendencia de los modelos R1 y P, es interesante mencionar que la PEA se ha asociado a efectos antiinflamatorios y antiobesidad (Mattace Raso et al., 2014; Hoareau & Roche, 2010). Considerando que los procesos inflamatorios han sido señalados como unos mecanismos biológicos que podrían estar involucrados en la programación metabólica (Bolton & Bilbo, 2014; Schwarz, Hutchinson, & Bilbo, 2011; Wang, Athayde, & Trudinger, 2003; Dahlgren et al., 2001), la disminución en los niveles de PEA sugiere la posibilidad de la presencia de un estado inflamatorio en la descendencia R1 y P al nacimiento, situación que podría haber aumentado la probabilidad de padecer los trastornos metabólicos previamente comentados, donde además los procesos inflamatorios juegan un importante papel (Rana, Nieuwdorp, Jukema, & Kastelein, 2007). Esta posibilidad no es descartable para las hembras R2. Pese a que en las mismas, no pudo realizarse un seguimiento posterior, el bajo peso al nacimiento que presentaron se ha relacionado en otros estudios con resultados adversos metabólicos y conductuales en la descendencia (Akitake et al., 2015; Lukaszewski et al., 2011; Desai et al., 2005).

De forma interesante, y a diferencia de los hallazgos en el modelo R1 y P, en el modelo R2, donde las crías nacieron con bajo peso, observamos un descenso significativo de la OEA en el hipotálamo de los machos. Aunque en este modelo, a diferencia de los restantes y

como se apuntaba previamente, no se realizó un seguimiento de la descendencia en etapas posteriores, estos valores disminuidos de OEA sí podrían estar relacionados con la hiperfagia postnatal ampliamente descrita en los animales con bajo peso al nacimiento (Breton et al., 2009; Desai et al., 2005; Vickers et al., 2000), que a su vez ha sido asociada a un crecimiento compensador rápido y a la consiguiente alteración en el perfil metabólico de la descendencia en etapas posteriores de la vida (Desai, Gayle, Han, & Ross, 2007; Bieswal et al., 2006; Desai et al., 2005). El hecho de que los animales machos expuestos a dieta P, que también presentaron bajo peso al nacimiento, no presentara alteraciones en esta NAE implicada en el apetito, resulta coherente con el hecho de que los mismos mantuvieran un bajo peso durante todo el periodo de lactancia y sólo lograran alcanzar el peso de los controles al final de adolescencia-principio de edad adulta, exhibiendo por tanto un crecimiento compensador lento (**artículo 6**).

De acuerdo con la hipótesis “*direct/double hit*” previamente comentada, los niveles de endocannabinoides y NAEs hipotalámicos alterados por una dieta materna inadecuada podría haber alterado la conectividad sináptica a nivel hipotalámico. Considerando que el hipotálamo se conecta con otras regiones cerebrales pero también con otros órganos periféricos, a través del sistema nervioso simpático y parasimpático (Das, 2011; Seoane-Collazo et al., 2015), la alteración en los niveles endocannabinoides al nacimiento podría haber modificado estas conexiones dando cuenta de las anormalidades metabólicas previamente comentadas, incluyendo entre las mismas las alteraciones en la expresión de ciertos componentes del sistema endocannabinoide en tejidos periféricos y/o hipotálamo. Coherentemente, hallamos que en el modelo de dieta materna restringida (R1), donde la afectación de los endocannabinoides hipotalámicos fue más extensa y significativa, las manifestaciones metabólicas eran mucho más acentuadas, incluyendo entre ellas las alteraciones en la expresión de genes del sistema endocannabinoide, como por ejemplo sobreexpresión de los receptores *Cnr1* y *Cnr2* en el hipotálamo (**artículo 3**).

Con respecto al hipocampo encontramos alteraciones en los endocannabinoides tras la exposición a dietas maternas inadecuadas. Estos resultados son compatibles con los de otras investigaciones que muestran alteraciones en los endocannabinoides hipocampales tras someter a los animales a diferentes dietas (Zamberletti et al., 2016; Rivera et al., 2012; D'Asti et al., 2010; Hanus et al., 2003; Hao, Avraham, Mechoulam, & Berry, 2000). En nuestro estudio observamos más diferencias entre los modelos, incluso en direcciones opuestas. Pese a ello, de nuevo en los modelo R1 y P encontramos aspectos comunes,

constatando en general una disminución en los niveles de endocannabinoides y/o lípidos relacionados. Así, en el modelo R1 detectamos principalmente una importante reducción de la AEA, junto con una tendencia estadística a menores niveles de ácido araquidónico, no viéndose afectados los restantes endocannabinoides y lípidos relacionados. De forma similar una reducción de la AEA fue hallada en el modelo P, pero en este caso también se encontró una disminución en las concentraciones de PEA. Ante la disminución selectiva de la AEA en ambos modelos, y considerando que la misma se forma a partir del ácido araquidónico esterificado en la posición s-1, a diferencia de lo que ocurre para la síntesis de 2-AG, que requiere del ácido araquidónico esterificado en posición s-2 (Di Marzo, 2008), un descenso selectivo de AA en posición s-1, que posiblemente daría cuenta de la tendencia a presentar descenso del AA en ambos modelos, podría haber justificado los menores niveles de AEA sin cambios significativos en 2-AG. También una alteración en las enzimas de síntesis o degradación podría explicar la reducción de la AEA. Este aspecto podría haber sido especialmente importante en el modelo P, en el que encontramos también una reducción en la PEA, que es una NAE que comparte con la AEA las mismas enzimas de síntesis y degradación (Fezza et al., 2014). El hecho de que las NAEs puedan competir con las enzimas de síntesis o hidrólisis y modulen alostéricamente la ocupación de los receptores (Fezza et al., 2014), podría también explicar la ausencia de cambios en la OEA. Por tanto, tanto una actividad deficitaria de las enzimas de síntesis, como la NAPE-PLD, o una actividad incrementada de la enzima de degradación FAAH podrían haber contribuido a disminuir los niveles de estos compuestos lipídicos, sin afectar al precursor.

Es interesante el hecho de que la facilitación de la señalización de anandamida, a través de inhibidores de la FAAH, haya sido asociada a un efecto neuroprotector en el hipocampo ante la exposición a estímulos adversos (Vilela et al., 2015), pero también a efectos ansiolíticos (Haller et al., 2009). Además, el hecho de que la administración en bajas dosis de AEA pueda revertir las alteraciones en neurotransmisores hipocámpales y/o funciones vinculadas al hipocampo en animales expuestos a restricción calórica (Hao et al., 2000), realza también el papel que tiene este endocannabinoide en el hipocampo. En este estudio la asociación de estos niveles reducidos de AEA en el hipocampo, podría haber perturbado el desarrollo de esta estructura y haber dado cuenta del mayor número de respuestas ansiosas que presentaron estos animales, en especial considerando el importante papel del hipocampo en la regulación emocional (Lutz et al., 2015). La alteración adicional de la PEA, NAE con propiedades antiinflamatorias (Hoareau & Roche, 2010), en el modelo P

podría también estar involucrada en la exacerbación del fenotipo ansioso encontrado en los machos P, considerando especialmente el hecho de que los procesos inflamatorios han sido ligados a un defectivo desarrollo cerebral y a una inadecuada programación conductual (Bolton & Bilbo, 2014). En este sentido, sería interesante ahondar en la funcionalidad hipocampal de animales expuestos a dietas maternas anómalas mediante estudios de memoria espacial o de electrofisiología hipocampal, en las que el sistema endocannabinoide tiene un papel crucial.

En el modelo R2, encontramos curiosamente un efecto opuesto, observándose en los machos un aumento en las concentraciones de AA y 2-AG, mientras que en las hembras se halló un aumento de AEA, AA y PEA. Ante esta situación, paradójica se pueden plantear varias hipótesis que incluyen la posibilidad de que el pico de 2-AG, descrito en la totalidad del cerebro en el día posnatal 1 (Berrendero et al., 1999), se hubiera producido prematuramente en el caso de los machos, que una actividad deficiente de la FAAH hubiera dado cuenta de las mayores concentraciones de AEA y PEA en las hembras y/o la posibilidad de un efecto adaptativo compensador para preservar el desarrollo del hipocampo, tal y como se ha argumentado en el **artículo 4**. El significado de este aumento de los endocannabinoides y/o lípidos relacionados en el hipocampo es incierto, más teniendo en cuenta que en este modelo no se realizó un seguimiento posterior. Se podría hipotetizar, que la transferencia placentaria y el depósito preferencial de los PUFAs (especialmente el AA) en el hipocampo de animales expuestos a restricción calórica durante la gestación completa, podría haber favorecido el incremento de los endocannabinoides en un intento de aminorar los efectos potencialmente negativos de la restricción calórica en esta estructura, implicada en el control emocional y aprendizaje. Esta posibilidad se basa en los hallazgos previamente descritos que muestran que el aumento de endocannabinoides, específicamente el 2-AG en el hipocampo de animales calóricamente restringidos, pero suplementados con dieta rica en pescado, ha sido relacionado con mitigación de alteraciones cognitivas y aprendizaje (Avraham et al., 2011). Por otra parte, considerando la asociación de esos niveles aumentados en el hipocampo con el bajo peso para la edad gestacional que presentaron los animales al nacer, probablemente asociado a un crecimiento restringido, no se puede descartar la posibilidad de que el hallazgo pudiera tener alguna implicación patológica (Faa et al., 2016).

En el bulbo olfatorio, una estructura implicada en la regulación del metabolismo y conducta de la ingesta junto con los endocannabinoides (Soria-Gomez et al., 2014) no se



hallaron alteraciones significativas en la descendencia macho de ninguno de los modelos estudiados, aunque sí se constató una tendencia a presentar menores niveles de anandamida igualmente en los grupos P y R, que podría hacer válidas las anteriores hipótesis planteadas. De forma interesante, en el modelo R2 las hembras presentaron una disminución en los niveles de AEA, AA y PEA, indicando que esta estructura podría ser más vulnerable a la exposición a estímulos adversos en este sexo, de forma similar a como ha sido previamente estudiado (de Souza, Szawka, Centenaro, Diehl, & Lucion, 2012).

## **4.2 La exposición a dietas maternas inadecuadas (dieta restringida y/o hipercalórica) altera la expresión de genes de diferentes componentes del sistema endocannabinoide en tejidos metabólicamente relevantes**

En los modelos R1 y P, se evaluó en la etapa adulta la expresión de genes relacionados con el metabolismo, como anteriormente se comentó, incluyendo también a diferentes componentes del sistema endocannabinoide. Aunque diferentes estudios habían mostrado que diferentes condiciones dietéticas pueden modificar la expresión de genes del SEC en diferentes tejidos incluido el cerebro (Vida et al., 2014; Cluny et al., 2013; Bello et al., 2012; Timofeeva et al., 2009; Starowicz et al., 2008; Thanos et al., 2008; Harrold et al., 2002), de forma interesante en nuestro estudio encontramos, en animales adultos únicamente expuestos a dietas maternas inadecuadas en periodos críticos del desarrollo y mantenidos con dieta estándar durante el resto de su vida, alteraciones en la expresión genes del sistema endocannabinoide en tejidos relacionados con el metabolismo. Ello es compatible con la idea de que ante la exposición a condiciones nutricionales inadecuadas en el periodo perinatal, la descendencia podría haber puesto en marcha complejos mecanismos adaptativos (Gluckman & Hanson, 2004; Hales & Barker, 2001), entre los cuales destacarían las modificaciones en el sistema endocannabinoide.

Específicamente en el modelo R1, en el hipotálamo encontramos alteraciones en la expresión de genes del SEC, que fueron más destacables en el caso de los machos. Así en los mismos, observamos un aumento en la expresión del receptor *Cnr1* y *Cnr2* en la totalidad del hipotálamo, contrastando con la regulación a la baja de genes del SEC en tejidos periféricos. Considerando los bajos niveles de endocannabinoides que presentaron

estos animales al nacimiento en esta estructura, los datos apoyan la idea de que podría haberse producido una adaptación a largo plazo tras una reducción del tono endocannabinoide en un periodo crítico. Por otra parte, la expresión al alza de receptor CB<sub>1</sub> hipotalámico podría ir asociada a la resistencia a la leptina, que podrían haber presentado estos animales, tal y como han puesto en relieve algunos estudios (Cardinal et al., 2014; Thanos et al., 2008). La mayor actividad del receptor CB<sub>1</sub> en el hipotálamo podría ser compatible a su vez con el aumento del peso exhibido en estos animales en ausencia de hiperfagia, por una posible reducción en el gasto energético de forma similar a como ha sido previamente mostrado (Cardinal et al., 2012). En cuanto al posible significado de la expresión incrementada del receptor *Cnr2*, la ausencia de hiperfagia que mostraron estos animales podría ser un factor relacionado (Verty, Stefanidis, McAinch, Hryciw, & Oldfield, 2015).

En el modelo P, no se encontraron alteraciones hipotalámicas en los machos en la expresión de genes relacionados con el SEC, pese a que éstos habían presentado niveles reducidos de endocannabinoides al nacimiento. En este modelo los machos, tras el destete con una dieta estándar, lograron alcanzar el peso de los controles, indicando la presencia de crecimiento compensador lento. Considerando que este tipo de crecimiento ha sido descrito como menos deletéreo (Coupe, Grit et al., 2009; Desai et al., 2005), la ausencia de cambios en la expresión de genes del SEC en el hipotálamo adulto, podría indicar una posible recuperación en estos animales. Sin embargo, los importantes cambios conductuales ante la presencia de comida altamente palatable, que sugieren afectación del sistema de recompensa, no excluyen la posibilidad de que se hubieran producido alteraciones en la formación de conexiones con el hipotálamo y sistema límbico, tras una inadecuada señalización cannabinoide en un periodo crítico (Keimpema et al., 2013). Tampoco es descartable que hubiera habido cambios en núcleos hipotalámicos específicos (Soria-Gomez, Massa et al., 2014; Timofeeva et al., 2009), tal y como se ha comentado en el **artículo 6**, siendo ésta una limitación de nuestra investigación. Curiosamente, en las hembras de esta condición P encontramos una expresión génica similar a la de los machos R1 pero asociado a un fenotipo casi opuesto. En estos animales, se halló también una sobreexpresión del receptor *Cnr1* asociada a delgadez e hiperfagia, lo que sugeriría un aumento en el gasto energético. La tendencia a sobreexpresar el receptor *Cnr2* en las hembras P, también podría haber relacionado con el fenotipo delgado que las mismas exhibían (Romero-Zerbo et al., 2012).

En el hígado encontramos un patrón de expresión génica muy similar entre los modelos estudiados, hallándose principalmente las alteraciones más significativas en las hembras. Particularmente en ambos modelos hallamos en las mismas una expresión disminuida de las enzimas de degradación de los endocannabinoides, particularmente la *Mgll* y la *Faab*. Esto sugiere que los niveles de endocannabinoides podrían estar aumentados en este tejido y de esta manera dar cuenta de las alteraciones en el perfil lipídico, más específicamente colesterol, encontrados en las hembras en ambos modelos de forma similar a como se ha planteado previamente (Osei-Hyiaman et al., 2005). Específicamente, se ha puesto de manifiesto que los niveles aumentados de AEA y 2-AG se asocian con disminución en la expresión de la Apo A-1, que es una apolipoproteína componente del colesterol HDLc (Haas, Mazza, Wong, & Mooradian, 2012). Estos efectos parecen estar mediados por la activación del receptor CB<sub>1</sub> (Haas et al., 2012). Curiosamente en nuestro estudio, encontramos una disminución en la expresión de este receptor, que fue altamente significativo en el modelo R1. Dada la correlación de esta disminución en la expresión con las alteraciones lipídicas encontradas en los animales hembra de ambos modelos, no es descartable que pudiera haber habido una hipersensibilidad de los mismos receptores CB<sub>1</sub>. Por otra parte, considerando que los animales estaban mantenidos desde el destete con una dieta estándar y, a salvedad de las alteraciones plasmáticas, no exhibían otras alteraciones metabólicas, esa disminución en la expresión del receptor *Cnr1* podría indicar un efecto adaptativo ante el aumento de los niveles de endocannabinoides, que en condiciones nutricionales más adversas pudieran haber exacerbado las alteraciones metabólicas, de forma similar a como ha sido descrito en otros estudios (Dahlhoff et al., 2014; Lukaszewski et al., 2011; Howie, Sloboda, Kamal, & Vickers, 2009; Samuelsson et al., 2008; Desai et al., 2007; Srinivasan et al., 2006; Vickers, Breier, Cutfield, Hofman, & Gluckman, 2000). También la disminución en la expresión de la enzima *Mgll* junto con la sobreexpresión encontrada en las hembras de *Cnr2*, podría haber justificado la menor afectación fenotípica que exhibieron en general las hembras ante la exposición a condiciones nutricionales adversas (Vujic et al., 2016; Taschler et al., 2011). Es destacable el hecho de que la alteración hepática fuera más pronunciada en las hembras R1. En las mismas los cambios en la expresión génica del sistema endocannabinoide se asociaron a hiperglucemia, junto con alteraciones en la expresión de genes lipogénicos, los relacionados con la  $\beta$ -oxidación, los genes *Ppars* así como los reguladores de la síntesis de colesterol, comentados anteriormente (**artículo 3**).

En el tejido adiposo perirrenal, encontramos de nuevo un patrón similar entre los modelos con alteraciones más robustas en los machos, y particularmente en los machos R1. Específicamente, en los mismos se encontró una expresión a la baja de las enzimas de degradación *Mgll*, pero especialmente *Faab*, la enzima degradadora de AEA, lo que podría justificar en parte el fenotipo obeso de estos animales asociado a hiperleptinemia, alteraciones en los lípidos plasmáticos y mayor adiposidad perirenal (Tourino, Oveisi, Lockney, Piomelli, & Maldonado, 2010). Es interesante destacar que estas alteraciones fueron detectadas junto con modificaciones en la expresión de enzimas implicadas en la  $\beta$ -oxidación, cadena respiratoria mitocondrial y alteraciones en el *Ppar $\gamma$* , las cuales podrían contribuir a explicar la mayor afectación metabólica de los machos expuestos a restricción calórica, como anteriormente se argumentó. Resultó curioso el hecho de que estos animales exhibieran una disminución en la expresión de las enzimas de síntesis de 2-AG, a diferencia de lo encontrado en otros estudios en sujetos obesos (Engeli et al., 2014). El hecho de que las alteraciones fueran acompañados de una disminución de la enzima de degradación, sugiere la posibilidad de un efecto compensatorio para mantener unos adecuados niveles de 2-AG en el tejido graso, que en circunstancias nutricionales más adversas pudiera exacerbar el fenotipo metabólico. De forma similar, en el modelo P, los machos exhibieron alteraciones en la enzima *Faab* y *Daglb*, junto con alteraciones en la expresión de la enzima lipogénica *Acaca*. Estas alteraciones podrían igualmente justificar el fenotipo de estos animales destetados con una dieta estándar, caracterizado por un aumento de adiposidad abdominal junto con hiperleptinemia, hiperlipemia y normopeso. Es destacable el hecho de que las hembras P, con mayor adiposidad perigonadal, exhibieran una expresión elevada del receptor *Cnr1* en el tejido graso perirrenal, junto con una sobreexpresión del receptor *Cnr2* al comparar con los machos. De nuevo este hallazgo, que es similar con lo encontrado en las hembras R1, plantea la posibilidad que la regulación al alza de receptor *Cnr2* pudiera tener un efecto protector como ha sido sugerido en algunos estudios recientes (Morales, Hernandez-Folgado, Goya, & Jagerovic, 2016; Verty et al., 2015).

La presencia de estos cambios, en animales mantenidos durante gran parte de su vida con una dieta estándar y únicamente expuestos a dietas inadecuadas en el periodo perinatal, sugiere que estas alteraciones, que en algunos tejidos podrían tildarse de sutiles, en presencia de condiciones dietéticas más adversas podrían exacerbarse favoreciendo el claro debut de enfermedades metabólicas. Por tanto, la adaptación del sistema endocannabinoide a unas inadecuadas condiciones nutricionales en periodos críticos del desarrollo podría ser

clave, junto a otros mecanismos, para explicar la vulnerabilidad aumentada a padecer trastornos metabólicos y conductuales en la descendencia ampliamente descrita en la literatura. Por otra parte, la asociación de estos cambios en la expresión de genes fundamentalmente con aspectos metabólicos, apoya parcialmente la tercera hipótesis que plantéabamos en la investigación y que sostenía la idea de que los cambios metabólicos y conductuales estaban mediados por alteraciones en la expresión de genes del sistema endocannabinoide y genes relacionados. Nuevos estudios en estos modelos que hagan más extenso el análisis a otras regiones cerebrales podrán confirmar la asociación de conductas alteradas con modificaciones en el cerebro adulto.

Una limitación adicional del presente estudio es que no se pudieron monitorizar los niveles de endocannabinoides y expresión de genes en los distintos momentos del ciclo vital, lo cual hubiera dado más pistas de cómo se iban readaptando los animales a las condiciones dietéticas posteriores al insulto nutricional. Sin embargo, nuestra investigación representa una primera aproximación al estudio de la participación del sistema endocannabinoide en el proceso de programación, abriendo cuestiones que podrían abordarse en el futuro.

## **5. DIMORFISMO SEXUAL EN LA DESCENDENCIA SOMETIDA A DIFERENTES DIETAS MATERNAS EN EL PERIODO PERINATAL**

A lo largo de esta investigación se han ido detallando los aspectos diferenciales en función del sexo en cada una de las variables analizadas, a excepción de los endocannabinoides al nacimiento, donde únicamente pudieron evaluarse en la descendencia macho y hembra en el modelo R2. En este caso, aunque en general se encontró un perfil común de disminución de endocannabinoides y lípidos relacionados hipotalámicos y aumento en los endocannabinoides y lípidos relacionados hipocampales, se halló un perfil sexo dependiente específico en las distintas estructuras analizadas. Resultó especialmente destacable el hecho de que en las hembras se encontrara una afectación del bulbo olfatorio y una alteración general de la PEA en todas las estructuras, sugiriendo que pese a la presencia de un fenotipo delgado común, las diferencias sexuales podrían estar presentes

desde periodos muy tempranas e involucrarían al sistema endocannabinoide.

En los modelos en los que se realizó un seguimiento posterior, el dimorfismo sexual fue un factor común en numerosas de las variables estudiadas. Así, encontramos en la descendencia R1 que los machos, con rasgos ansiosos y cambios en la respuesta al AM251, exhibieron sobrepeso, en ausencia de hiperfagia junto con hiperleptinemia, adiposidad perirrenal y alteraciones más exacerbadas en los lípidos plasmáticos. Estos cambios se asociaron a cambios en el perfil de expresión de genes del sistema endocannabinoide en tejidos metabólicamente relevantes y genes reguladores de la síntesis de lípidos y colesterol y genes *Ppars*, principalmente en el tejido graso. En cambio, en las hembras, también con rasgos ansiosos pero menos exacerbados, se observaron cambios en la conducta de la ingesta ante la presencia de una comida altamente palatable, se encontró normopeso, hiperglucemia y alteraciones en el perfil lipídico asociadas a cambios en el sistema endocannabinoide, genes *Ppars* y genes reguladores del metabolismo, principalmente en el hígado. En el caso de la descendencia P, los machos presentaron normopeso con importante adiposidad abdominal, hiperleptinemia, cambios en el perfil lipídico, asociados a modificaciones en la expresión de genes del SEC y genes lipogénicos en el tejido graso perirrenal. Además, los mismos exhibieron alteraciones más exacerbadas en las conductas relacionadas con la ansiedad, mostrando una respuesta diferente ante la administración del AM251. Las hembras de esta condición, que mostraban un fenotipo menos ansioso, sin cambios ante la administración del AM251, por su parte exhibían bajo peso con hiperfagia durante gran parte de su vida, adiposidad perigonadal y alteraciones en los lípidos plasmáticos. Los mismos cambios se asociaron a alteraciones en la expresión de las enzimas de degradación del SEC en el hígado y también a sobreexpresión del *Cnr1* en el hipotálamo y grasa (**tabla 5**).

Por tanto, observamos de forma general, una aparente exacerbación de las anormalidades metabólicas y conductuales en los machos. Estos datos son coherentes con algunas investigaciones previas que han mostrado alteraciones más robustas en este sexo tanto, tras la exposición a dietas maternas restringidas (Palou et al., 2010) como a hipercalóricas (Dahlhoff et al., 2014; Nivoit et al., 2009; Nivoit et al., 2009). Dentro de las posibles explicaciones a este dimorfismo sexual se han señalado varias alternativas que incluyen diferencias en metilación del ADN placentario en función del sexo (Gallou-Kabani et al., 2010), el papel de las hormonas gonadales (Clegg et al., 2006; Rodriguez de Fonseca et al., 1994) o la diferencias sexuales en cuanto a la sensibilidad a la leptina (Clegg et al., 2003). Es

interesante el hecho de que en nuestro estudio en general encontráramos en las hembras al quinto mes postnatal una sobreexpresión del receptor *Cnr2*, junto con menores alteraciones metabólicas. Considerando el hecho de que algunos autores han señalado empeoramiento del perfil metabólico de las hembras en etapas próximas al cese estrogénico (Dahlhoff et al., 2014) y el potencial terapéutico de los agonistas de los receptores  $CB_2$  en enfermedades metabólicas (Verty et al., 2015), los datos podrían sugerir que esta regulación al alza podría estar asociada al menor riesgo metabólico del sexo femenino en la etapa premenopáusicas. No obstante, la presencia de alteraciones más extensas en las hembras de la condición R2 al nacimiento, no puede descartar que en otros parámetros no evaluados en nuestro estudio, esa aparente menor afectación de las hembras pudiera no ser evidente.

**Tabla 5. Efectos metabólicos y conductuales tras la exposición a dietas maternas inadecuadas en la descendencia de ambos sexos**

	<b>Machos R1</b>	<b>Hembras R1</b>	<b>Machos P</b>	<b>Hembras P</b>
<b>Relación peso/ingesta</b>	Sobrepeso en ausencia de hiperfagia en etapa adulta. Normopeso en infancia.	Normopeso y normoingesta toda su vida	Normopeso en etapa adulta a expensas de hiperfagia sólo en infancia. Bajo peso al nacer	Bajo peso toda su vida aunque exhiben hiperfagia parte de la misma
<b>Perfil lipídido</b>	El más exacerbado en comparación con el resto	Alterado	Más exacerbado en machos P que en hembras P	Alterado
<b>Perfil glucémico</b>	Normal	Alterado	Normal	Normal
<b>Adiposidad</b>	Mayor adiposidad perirrenal	Normal	Mayor adiposidad abdominal	Mayor adiposidad perigonadal
<b>Expresión genes del SEC y del metabolismo lipídico/colesterol o genes Ppars</b>	Alteraciones en PAT e hipotálamo	Alteración en hígado	Alteración en PAT	Alteración en hipotálamo, hígado y PAT
<b>Conducta ingesta</b>	Alterada sutilmente en test AM251	Alterada sutilmente en test de ingesta (TIC AM251)	Muy alterada en test AM251 y TIC	Alterada en TIC
<b>Conductas relacionadas con la ansiedad</b>	Rasgos ansiosos principalmente en laberinto en cruz elevado (más respuestas alteradas que en hembras R1)	Conductas relacionadas con la ansiedad en laberinto en cruz elevado	Rasgos muy ansiosos, sobre todo en laberinto en cruz elevado y campo abierto	Rasgos ansiosos en el laberinto en cruz elevado y campo abierto

## 6. SIMILITUDES Y DIFERENCIAS ENTRE LOS MODELOS DE DIETA MATERNA INADECUADA ESTUDIADOS

En el presente estudio encontramos varias similitudes en los modelos estudiados, pese a la exposición a dietas maternas completamente distintas. Específicamente hallamos en la descendencia anomalías metabólicas y conductuales que fueron asociadas a alteraciones en el sistema endocannabinoide, observándose al nacimiento en general una regulación a la baja de los endocannabinoides y/o lípidos relacionados en las estructuras cerebrales, fundamentalmente en el hipotálamo, en todos los modelos y también encontramos en los modelos R1 Y P, donde se realizó un seguimiento a largo plazo, un perfil similar de afectación sexo-dependiente en los tejidos periféricos (hígado y grasa). Analizando las características de las dietas, encontramos en común que la ingesta proteica de las madres durante la gestación estuvo disminuida en los modelos R1 y P (**figura complementaria 1, supplementary figure 1, artículo 5**), lo cual plantea la posibilidad de que fuera este aspecto crítico para las anormalidades detectadas.

Es interesante recalcar que en los modelos estudiados las dietas que se emplearon no fueron dietas extremas, pues en el caso de la restricción calórica se eligió una dieta de restricción moderada, que permitía comer el 80% de lo ingerido por el grupo control. También en el modelo P, los animales fueron asignados a una dieta de libre elección, donde no se les forzaba a comer una dieta específica, sino que se les dejaba elegir entre dos posibles dietas. Estos aspectos asemejarían las condiciones experimentales con la conducta de la ingesta humana. En ambos casos, los efectos observados en la descendencia destacarían la relevancia de la dieta materna no sólo durante la gestación sino también durante el periodo pregestacional. Este aspecto se hace especialmente evidente al constatar el impacto diferencial del mismo tipo de dieta implementada en distintos momentos críticos en los niveles de endocannabinoides cerebrales, como sucede en los modelos R1 y R2.

Por otra parte, es interesante destacar las principales diferencias entre los modelos y la relación que las mismas guardan con la alteración de endocannabinoides en el momento del nacimiento en estructuras claves para el metabolismo y conductas. Así, a lo largo de esta tesis se ha destacado la importante exacerbación de las alteraciones metabólicas



encontradas en el modelo R1, donde además se encontró una drástica disminución de los principales endocannabinoides al nacimiento. Por otra parte, la exacerbación del fenotipo ansioso en el modelo P, donde además de encontrarse afectación hipocampal de la AEA se encontró alteración en la PEA, sugiere la posibilidad de la responsabilidad de la alteración de esta estructura y/o de los procesos inflamatorios en etapas tempranas en el fenotipo conductual observado. Por otro lado, aunque no se ha abordado todavía, sería fundamental conocer como se expresa el sistema endocannabinoide en la amígdala de estos animales con fenotipo de ansiedad, una estructura que no pudo abordarse al nacimiento pero que si se está estudiando en los animales adultos en este momento.

## 7. IMPLICACIONES CLÍNICAS Y PARA FUTURAS INVESTIGACIONES

La presente investigación, aunque ha sido realizada en un modelo animal, plantea algunas cuestiones que podrían ser de utilidad para la práctica clínica. En primer lugar, muestra el importante impacto que tiene la dieta materna en el desarrollo metabólico y conductual de la descendencia. Ello puede resultar de gran interés para los profesionales involucrados en la salud materno-infantil pero también en la salud mental y así mejorar la comprensión de las personas con patologías o trastornos conductuales que podrían tener un origen temprano. Particularmente, nuestro estudio enfatiza el papel del periodo preconcepcional, en especial considerando las alteraciones metabólicas descritas en los modelos R1 y P. En general, los resultados sugieren que mejorar las condiciones nutricionales en las futuras madres desde el periodo previo a la concepción podría ser de gran utilidad, realizándose así el papel de las medidas de prevención primaria y la necesidad de la consulta preconcepcional (Hadar, Ashwal, & Hod, 2015), donde el empleo de técnicas de modificación de conducta para modificar hábitos inadecuados podría ser considerado.

Por otra parte, el hecho de que algunas madres hubieran mantenido una ganancia ponderal normal durante la gestación, evidente en uno de los modelos de dieta materna inadecuada, y sus descendientes hubieran presentado alteraciones metabólicas y conductuales, pone en evidencia que la simple monitorización de la ganancia de peso durante la gestación, podría no ser suficiente, requiriéndose probablemente de instrumentos de evaluación de los hábitos dietéticos maternos más precisos. Además, esta investigación ha confirmado que la

presencia de normopeso al nacimiento, no garantiza que el feto haya mantenido un ambiente nutricional adecuado durante toda la gestación. Así, estos aspectos de nuevo sugieren la importancia de evaluar el estado nutricional de las gestantes de una forma más exhaustiva, desde periodos que incluyan la preconcepción. De esta manera, identificar a los niños que pudieran tener riesgo de presentar alteraciones metabólicas y/o conductuales en el futuro, para poder hacerles un seguimiento más continuado, podría ser una estrategia acertada, tal y como ha sido propuesto por otros autores (Perrone, Santacroce, Picardi, & Buonocore, 2016). Por otra parte, la detección precoz de la presencia de alteraciones metabólicas y conductuales en personas vulnerables, podría favorecer la implementación de medidas de prevención secundaria de índole física y psicológica, que ayudaran a paliar o retrasar el desarrollo de consecuencias más adversas.

Por último, esta investigación ha destacado que el sistema endocannabinoide está involucrado en el fenómeno de la programación metabólica y conductual, habiéndose a su vez asociado a alteraciones en otros componentes lipídicos y/o implicados en los procesos inflamatorios. Estos aspectos pondrían en relieve la importancia de buscar terapias eficaces para revertir o paliar los efectos de una mala programación. En ese sentido, podría resultar interesante explorar el potencial terapéutico de fármacos que en este momento están en investigación, como son los agonistas de los receptores CB<sub>2</sub> (Morales et al., 2016; Verty et al., 2015), así como la PEA (Mattace Raso et al., 2014), dada su relación con aspectos potencialmente protectivos hallados en esta investigación. Por otra parte, esta investigación evidencia la necesidad de indagar sobre las dietas maternas más adecuadas para prevenir estos procesos. En este sentido, resulta interesante la investigación sobre los efectos de los suplementos de ácidos grasos omega 3, que en la actualidad están en pleno desarrollo (van Dijk et al., 2016; De Giuseppe, Roggi, & Cena, 2014; Rogers, Valentine, & Keim, 2013), puesto que los mismos podrían afectar a los niveles de endocannabinoides de forma similar a como ha sido previamente constatado, bien disminuyendo los niveles (Artmann et al., 2008; Watanabe et al., 2003), a través de la competición que ejercen con el ácido araquidónico, o incluso aumentándolos en algunas circunstancias (Dyall et al., 2016; Avraham et al., 2011;). Considerando el impacto de una inadecuada señalización cannabinoide en periodos críticos, que hemos confirmado en nuestro estudio, resulta muy pertinente el abordaje de estos aspectos en el futuro. Ello podría suponer un nuevo avance en el intento de comprender la complejidad del fenómeno de la programación y aproximarse a su terapia eficaz.

## CONCLUSIONES

El presente trabajo ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. La exposición a una dieta restringida o hipercalórica/altamente palatable en el periodo perinatal altera la gestación y sus productos perinatales, bien modificando la ganancia ponderal de las madres en los distintos periodos de estudio o alterando el tamaño de la camada, el peso al nacimiento y/o mortalidad en las crías.
2. La exposición a una dieta restringida o hipercalórica/altamente palatable en el periodo perinatal altera los parámetros de crecimiento y metabólicos de la descendencia, favoreciendo el desarrollo de características del síndrome metabólico en la etapa adulta, que a su vez se asocian a modificaciones en la expresión de genes implicados en el metabolismo.
3. La exposición a una dieta restringida o hipercalórica/altamente palatable en el periodo perinatal aumenta el riesgo de desarrollar conductas alteradas en etapas posteriores de la vida, específicamente hallándose un aumento en las respuestas relacionadas con la ansiedad y modificaciones en la conducta de la ingesta en la descendencia de ambos grupos, e incluyendo entre las mismas las modificaciones en la preferencia por comidas y en la respuesta ante el antagonismo farmacológico del receptor CB<sub>1</sub> con AM251.
4. La exposición a una dieta restringida o hipercalórica/altamente palatable en el periodo perinatal induce alteraciones en el sistema endocannabinoide. Estas modificaciones están presentes en la descendencia al nacimiento, como constata la presencia de cambios en los niveles de endocannabinoides y lípidos relacionados en diferentes áreas cerebrales en la descendencia recién nacida. Además, las alteraciones en este sistema persisten en la etapa adulta, como evidencian las modificaciones en la expresión génica de distintos componentes del sistema endocannabinoide en esta etapa, en presencia de una dieta estándar desde el destete.
5. Se encuentran diferencias sexualmente dimórficas en numerosas variables

estudiadas en los distintos modelos, evidenciándose, en general, en la descendencia macho alteraciones en el fenotipo metabólico y conductual aparentemente más exacerbadas. Además se observa un patrón sexo-dependiente en la expresión de los componentes del sistema endocannabinoide y/o genes implicados en el metabolismo lipídico, en tejidos metabólicamente relevantes analizados en la etapa adulta. En los animales expuestos a dieta restringida durante la totalidad de la gestación, la presencia de alteraciones sexo dependientes en los niveles de endocannabinoides y/o lípidos relacionados, junto con la presencia de un fenotipo delgado común al nacimiento, sugiere que el sistema endocannabinoide podría ser un mecanismo explicativo de estas diferencias, que además podrían originarse de forma muy temprana.

6. Existe gran paralelismo en los modelos estudiados, hallándose alteraciones metabólicas y conductuales y un perfil de afectación similar en el sistema endocannabinoide, pese a la exposición a dietas perinatales diferentes. Por otra parte, se encuentran alteraciones metabólicas muy robustas en la descendencia expuesta a restricción calórica, mientras que en la descendencia sometida a una dieta hipercalórica/altamente palatable se halla un fenotipo ansioso muy marcado, junto con alteraciones en la conducta de la ingesta y/o preferencias alimentarias más evidentes.

En conjunto los datos apoyan la principal hipótesis de la investigación, que sostenía que el sistema endocannabinoide podía estar involucrado en el fenómeno de la programación metabólica y conductual.

## CONCLUSIONS

The present study leads to the following conclusions:

1. The exposure to a restricted or hypercaloric/highly palatable diet during the perinatal period alters the perinatal outcomes. Specifically, it can modify the weight gain of dams during the different studied periods, or it can disturb the litter size, the pup body weight and/or mortality rate in the offspring.
2. The exposure to a restricted or hypercaloric/highly palatable diet during the perinatal period alters growing and metabolic parameters in the offspring. Particularly, it favors the development of metabolic syndrome features at adulthood, which were associated to modifications in the RNAm expression of genes involved in the metabolism.
3. The exposure to a restricted or hypercaloric/highly palatable diet during the perinatal period increases the risk to develop altered behaviors later in life. Specifically, it has been found increased anxiety related responses and alterations in the feeding behavior in the offspring of both perinatal groups. These modifications include alterations in food preference and the response to the antagonist AM251.
4. The exposure to a restricted or hypercaloric/highly palatable diet during the perinatal period induces alterations in the endocannabinoid system. These modifications are detectable at birth, as it was shown by the alterations in the endocannabinoids and endocannabinoid related lipids in several brain regions in newborn offspring. Moreover, the alterations in the ECS remain during adulthood, after taking into account the modifications on the gene expression of several components of the ECS at this stage, even though the animals were maintained on standard chow since weaning.
5. Sexual dimorphism was found in several analyzed variables in both perinatal models. Particularly, it was found that the alterations in the metabolic and

behavioral phenotype seem more exacerbated in male offspring. Moreover, a sex-dependent profile on the gene expression of the ECS and metabolism-related genes at adulthood was observed. Considering that the sexual dimorphism alterations in the endocannabinoids and endocannabinoid-related lipids together with a common lean phenotype were found in the newborn offspring exposed to a maternal restricted diet during the entire pregnancy, the endocannabinoid system might be an explicative mechanism of these differences. Furthermore, these data suggests that the sexual dimorphism may have originated at very early stages.

6. A great parallelism was detected between both animal models. In general, it was found they had similar metabolic and behavioral alterations along with a coincident disturbance of the endocannabinoid system despite exposure to different perinatal diets. On the other hand, robust metabolic alterations in offspring exposed to a maternal calorie-restricted diet were observed, whereas offspring exposed to a maternal hypercaloric/highly palatable diet displayed an exacerbated anxious phenotype along with more evident alterations in the feeding behavior and/or food preference.

Taken together the data support the main hypothesis of this study which considered that the endocannabinoid system may be involved in metabolic and behavioral programming.

## REFERENCIAS

- Abu-Saad, K., & Fraser, D. (2010). Maternal nutrition and birth outcomes. *Epidemiologic Reviews*, *32*, 5-25. doi:10.1093/epirev/mxq001
- Acone, G., Trabucco, E., Colacurci, N., Cobellis, L., Mackie, K., Meccariello, R., . . . Cobellis, G. (2009). Low type I cannabinoid receptor levels characterize placental villous in labouring delivery. *Placenta*, *30*(2), 203-205. doi:10.1016/j.placenta.2008.11.018
- Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. (2014). *Estudio "ALADINO" 2013: Estudio de Vigilancia del Crecimiento, Alimentación, Actividad Física, Desarrollo infantil y Obesidad en España*. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2014 (Ed.)
- Aguado, T., Monory, K., Palazuelos, J., Stella, N., Cravatt, B., Lutz, B., . . . Galve-Roperh, I. (2005). The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *19*(12), 1704-1706. doi:10.1096/fj.05-3995fje
- Aguado, T., Palazuelos, J., Monory, K., Stella, N., Cravatt, B., Lutz, B., . . . Galve-Roperh, I. (2006). The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(5), 1551-1561. doi:10.1523/JNEUROSCI.4151-05.2006
- Aguirre, C. A., Castillo, V. A., & Llanos, M. N. (2012). Excess of the endocannabinoid anandamide during lactation induces overweight, fat accumulation and insulin resistance in adult mice. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, *4*(1), 35-5996-4-35. doi:10.1186/1758-5996-4-35; 10.1186/1758-5996-4-35
- Akitake, Y., Katsuragi, S., Hosokawa, M., Mishima, K., Ikeda, T., Miyazato, M., & Hosoda, H. (2015). Moderate maternal food restriction in mice impairs physical growth, behavior, and neurodevelopment of offspring *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, *35*(1), 76-87. doi:10.1016/j.nutres.2014.10.014 [doi]
- Alamy, M., & Bengelloun, W. A. (2012). Malnutrition and brain development: An analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *36*(6), 1463-1480. doi:10.1016/j.neubiorev.2012.03.009
- Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., . . . International Association for the Study of Obesity. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; american heart association; world heart federation;

- international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. *Circulation*, 120(16), 1640-1645. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644
- Albuquerque, K. T., Sardinha, F. L., Telles, M. M., Watanabe, R. L., Nascimento, C. M., Tavares do Carmo, M. G., & Ribeiro, E. B. (2006). Intake of trans fatty acid-rich hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 22(7-8), 820-829. doi:S0899-9007(06)00194-8
- Alen, F., Crespo, I., Ramirez-Lopez, M. T., Jagerovic, N., Goya, P., de Fonseca, F. R., . . . Orio, L. (2013). Ghrelin-induced orexigenic effect in rats depends on the metabolic status and is counteracted by peripheral CB1 receptor antagonism. *PLoS One*, 8(4), e60918. doi:10.1371/journal.pone.0060918; 10.1371/journal.pone.0060918
- Alen, F., Ramirez-Lopez, M. T., Gomez de Heras, R., Rodriguez de Fonseca, F., & Orio, L. (2013). Cannabinoid receptors and cholecystokinin in feeding inhibition. *Vitamins and Hormones*, 92, 165-196. doi:10.1016/B978-0-12-410473-0.00007-6; 10.1016/B978-0-12-410473-0.00007-6
- Allison Gray, C., Bartol, F. F., Taylor, K. M., Wiley, A. A., Ramsey, W. S., Ott, T. L., . . . Spencer, T. E. (2000). Ovine uterine gland knock-out model: Effects of gland ablation on the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 62(2), 448-456.
- Alvheim, A. R., Malde, M. K., Osei-Hyiaman, D., Lin, Y. H., Pawlosky, R. J., Madsen, L., . . . Hibbeln, J. R. (2012). Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-AG and anandamide and induces obesity. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 20(10), 1984-1994. doi:10.1038/oby.2012.38
- Alvheim, A. R., Torstensen, B. E., Lin, Y. H., Lillefosse, H. H., Lock, E. J., Madsen, L., . . . Malde, M. K. (2014). Dietary linoleic acid elevates the endocannabinoids 2-AG and anandamide and promotes weight gain in mice fed a low fat diet. *Lipids*, 49(1), 59-69. doi:10.1007/s11745-013-3842-y
- American College of Obstetricians and Gynecologists. (2013). ACOG committee opinion no. 548: Weight gain during pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*, 121(1), 210-212. doi:http://10.1097/01.AOG.0000425668.87506.4c
- Amusquivar, E., & Herrera, E. (2003). Influence of changes in dietary fatty acids during pregnancy on placental and fetal fatty acid profile in the rat. *Biology of the Neonate*, 83(2), 136-145. doi:67963
- Andreas, P. (2005). Perinatal programming and functional teratogenesis: Impact on body weight regulation and obesity. *Physiology & Behavior*, 86(5), 661-668. doi:10.1016/j.physbeh.2005.08.065
- Antonelli, T., Tomasini, M. C., Tattoli, M., Cassano, T., Tanganelli, S., Finetti, S., . . . Ferraro, L. (2005). Prenatal exposure to the CB1 receptor agonist WIN 55,212-2 causes learning disruption associated with impaired cortical NMDA receptor function and emotional reactivity changes in rat offspring. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 15(12), 2013-2020. doi:bhi076
- Arenz, S., Ruckerl, R., Koletzko, B., & von Kries, R. (2004). Breast-feeding and childhood obesity--a systematic review. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 28(10), 1247-1256. doi:10.1038/sj.ijo.0802758



- Arevalo-Martin, A., Garcia-Ovejero, D., Rubio-Araiz, A., Gomez, O., Molina-Holgado, F., & Molina-Holgado, E. (2007). Cannabinoids modulate Olig2 and polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the subventricular zone of post-natal rats through cannabinoid receptor 1 and cannabinoid receptor 2. *The European Journal of Neuroscience*, *26*(6), 1548-1559. doi:EJN5782
- Arrabal, S., Lucena, M. A., Canduela, M. J., Ramos-Uriarte, A., Rivera, P., Serrano, A., . . . Suarez, J. (2015). Pharmacological blockade of cannabinoid CB1 receptors in diet-induced obesity regulates mitochondrial dihydrolipoamide dehydrogenase in muscle. *PLoS One*, *10*(12), e0145244. doi:10.1371/journal.pone.0145244
- Artmann, A., Petersen, G., Hellgren, L. I., Boberg, J., Skonberg, C., Nellesmann, C., . . . Hansen, H. S. (2008). Influence of dietary fatty acids on endocannabinoid and N-acyl ethanolamine levels in rat brain, liver and small intestine. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1781*(4), 200-212. doi:10.1016/j.bbaliip.2008.01.006
- Austin, S. B., Melly, S. J., Sanchez, B. N., Patel, A., Buka, S., & Gortmaker, S. L. (2005). Clustering of fast-food restaurants around schools: A novel application of spatial statistics to the study of food environments. *American Journal of Public Health*, *95*(9), 1575-1581. doi:95/9/1575
- Avraham, Y., Saidian, M., Burston, J. J., Mevorach, R., Vorobiev, L., Magen, I., . . . Berry, E. M. (2011). Fish oil promotes survival and protects against cognitive decline in severely undernourished mice by normalizing satiety signals. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *22*(8), 766-776. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.07.001
- Baik, M., Rajasekar, P., Lee, M. S., Kim, J., Kwon, D., Kang, W., . . . Vu, T. T. (2014). An intrauterine catch-up growth regimen increases food intake and post-natal growth in rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *98*(6), 1132-1142. doi:10.1111/jpn.12170
- Bajzer, M., Obici, S., Olivieri, M., Haas, M. K., Pfluger, P. T., Magrisso, I. J., . . . Cota, D. (2011). Cannabinoid receptor 1 (CB1) antagonism enhances glucose utilisation and activates brown adipose tissue in diet-induced obese mice. *Diabetologia*, *54*(12), 3121-3131. doi:10.1007/s00125-011-2302-6
- Bambico, F. R., & Gobbi, G. (2008). The cannabinoid CB1 receptor and the endocannabinoid anandamide: Possible antidepressant targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *12*(11), 1347-1366. doi:10.1517/14728222.12.11.1347
- Barbieri, M. A., Portella, A. K., Silveira, P. P., Bettiol, H., Agranonik, M., Silva, A. A., & Goldani, M. Z. (2009). Severe intrauterine growth restriction is associated with higher spontaneous carbohydrate intake in young women. *Pediatric Research*, *65*(2), 215-220. doi:10.1203/PDR.0b013e31818d6850
- Barker, D. J. (1991). The intrauterine origins of cardiovascular and obstructive lung disease in adult life. the marc daniels lecture 1990. *Journal of the Royal College of Physicians of London*, *25*(2), 129-133.
- Barker, D. J. (1995). Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *311*(6998), 171-174.
- Barker, D. J. (2006). Birth weight and hypertension. *Hypertension*, *48*(3), 357-358. doi:10.1161/01.HYP.0000236552.04251.42

- Barker, D. J. (2007). The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine*, 261(5), 412-417. doi:JIM1809
- Barker, D. J., Hales, C. N., Fall, C. H., Osmond, C., Phipps, K., & Clark, P. M. (1993). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): Relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*, 36(1), 62-67.
- Barker, D. J., Winter, P. D., Osmond, C., Margetts, B., & Simmonds, S. J. (1989). Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*, 2(8663), 577-580. doi:S0140-6736(89)90710-1
- Bayol, S. A., Farrington, S. J., & Stickland, N. C. (2007). A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. *The British Journal of Nutrition*, 98(4), 843-851. doi:10.1017/S0007114507812037
- Bayol, S. A., Simbi, B. H., Bertrand, J. A., & Stickland, N. C. (2008). Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females. *The Journal of Physiology*, 586(13), 3219-3230. doi:10.1113/jphysiol.2008.153817; 10.1113/jphysiol.2008.153817
- Bellinger, L., & Langley-Evans, S. C. (2005). Fetal programming of appetite by exposure to a maternal low-protein diet in the rat. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 109(4), 413-420. doi:CS20050127
- Bellinger, L., Lilley, C., & Langley-Evans, S. C. (2004). Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat *The British Journal of Nutrition*, 92(3), 513-520. doi:S0007114504001977
- Bello, N. T., Coughlin, J. W., Redgrave, G. W., Ladenheim, E. E., Moran, T. H., & Guarda, A. S. (2012). Dietary conditions and highly palatable food access alter rat cannabinoid receptor expression and binding density. *Physiology & Behavior*, 105(3), 720-726. doi:10.1016/j.physbeh.2011.09.021
- Bellocchio, L., Lafenetre, P., Cannich, A., Cota, D., Puente, N., Grandes, P., . . . Marsicano, G. (2010). Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nature Neuroscience*, 13(3), 281-283. doi:10.1038/nn.2494; 10.1038/nn.2494
- Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Quarta, C., Metna-Laurent, M., Cardinal, P., Binder, E., . . . Marsicano, G. (2013). Activation of the sympathetic nervous system mediates hypophagic and anxiety-like effects of CB(1) receptor blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12), 4786-4791. doi:10.1073/pnas.1218573110; 10.1073/pnas.1218573110
- Belluscio, L. M., Berardino, B. G., Ferroni, N. M., Ceruti, J. M., & Canepa, E. T. (2014). Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors. *Physiology & Behavior*, 129, 237-254. doi:10.1016/j.physbeh.2014.02.051
- Bensaid, M., Gary-Bobo, M., Esclangon, A., Maffrand, J. P., Le Fur, G., Oury-Donat, F., & Soubrie, P. (2003). The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acip30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Molecular Pharmacology*, 63(4), 908-914.
- Berger, A., Crozier, G., Bisogno, T., Cavaliere, P., Innis, S., & Di Marzo, V. (2001). Anandamide and diet:

- Inclusion of dietary arachidonate and docosahexaenoate leads to increased brain levels of the corresponding N-acylethanolamines in piglets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 6402.
- Berghuis, P., Dobszay, M. B., Wang, X., Spano, S., Ledda, F., Sousa, K. M., . . . Harkany, T. (2005). Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19115-19120. doi:0509494102
- Berghuis, P., Rajnicek, A. M., Morozov, Y. M., Ross, R. A., Mulder, J., Urban, G. M., . . . Harkany, T. (2007). Hardwiring the brain: Endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5828), 1212-1216. doi:316/5828/1212
- Bermudez-Silva, F. J., Cardinal, P., & Cota, D. (2012). The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 26(1), 114-124. doi:10.1177/0269881111408458
- Bermudez-Silva, F. J., Suarez, J., Baixeras, E., Cobo, N., Bautista, D., Cuesta-Munoz, A. L., . . . Rodriguez de Fonseca, F. (2008). Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. *Diabetologia*, 51(3), 476-487. doi:10.1007/s00125-007-0890-y
- Bermudez-Silva, F. J., Viveros, M. P., McPartland, J. M., & Rodriguez de Fonseca, F. (2010). The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: The end or a new beginning? *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 95(4), 375-382. doi:10.1016/j.pbb.2010.03.012
- Bernard, C., Milh, M., Morozov, Y. M., Ben-Ari, Y., Freund, T. F., & Gozlan, H. (2005). Altering cannabinoid signaling during development disrupts neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), 9388-9393. doi:0409641102
- Berrendero, F., Sepe, N., Ramos, J. A., Di Marzo, V., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1999). Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse (New York, N.Y.)*, 33(3), 181-191. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(19990901)33:3<181::AID-SYN3>3.0.CO;2-R
- Bhatia, H. S., Agrawal, R., Sharma, S., Huo, Y. X., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2011). Omega-3 fatty acid deficiency during brain maturation reduces neuronal and behavioral plasticity in adulthood. *PLoS One*, 6(12), e28451. doi:10.1371/journal.pone.0028451
- Bieswal, F., Ahn, M. T., Reusens, B., Holvoet, P., Raes, M., Rees, W. D., & Remacle, C. (2006). The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 14(8), 1330-1343. doi:14/8/1330
- Bilbo, S. D., & Tsang, V. (2010). Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(6), 2104.
- Blüher, M., Engeli, S., Klötting, N., Berndt, J., Fasshauer, M., Bátkai, S., . . . Stumvoll, M. (2006). Dysregulation

- of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes*, 55(11), 3053-3060. doi:10.2337/db06-0812
- Bolton, J. L., & Bilbo, S. D. (2014). Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: Focus on inflammatory mechanisms *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 16(3), 307-320.
- Boney, C. M., Verma, A., Tucker, R., & Vohr, B. R. (2005). Metabolic syndrome in childhood: Association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics*, 115(3), e290-6. doi:115/3/e290
- Brand, T., Spanagel, R., & Schneider, M. (2012). Decreased reward sensitivity in rats from the Fischer344 strain compared to wistar rats is paralleled by differences in endocannabinoid signaling. *PLoS One*, 7(2), e31169. doi:10.1371/journal.pone.0031169
- Brenseke, B., Prater, M. R., Bahamonde, J., & Gutierrez, J. C. (2013). Current thoughts on maternal nutrition and fetal programming of the metabolic syndrome. *Journal of Pregnancy*, 2013, 368461. doi:10.1155/2013/368461; 10.1155/2013/368461
- Breton, C., Lukaszewski, M. A., Risold, P. Y., Enache, M., Guillemot, J., Riviere, G., . . . Vieau, D. (2009). Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 296(3), E462-72. doi:10.1152/ajpendo.90740.2008
- Brocato, B., Zoerner, A. A., Janjetovic, Z., Skobowiat, C., Gupta, S., Moore, B. M., 2nd, . . . Schlabritz-Loutsevitch, N. (2013). Endocannabinoid crosstalk between placenta and maternal fat in a baboon model (papio spp.) of obesity. *Placenta*, 34(11), 983-989. doi:10.1016/j.placenta.2013.08.007
- Bugianesi, E., McCullough, A. J., & Marchesini, G. (2005). Insulin resistance: A metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 42(5), 987-1000. doi:10.1002/hep.20920
- Burdyga, G., Lal, S., Varro, A., Dimaline, R., Thompson, D. G., & Dockray, G. J. (2004). Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(11), 2708-2715. doi:10.1523/JNEUROSCI.5404-03.2004
- Burton, G. J., Watson, A. L., Hempstock, J., Skepper, J. N., & Jauniaux, E. (2002). Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(6), 2954-2959. doi:10.1210/jcem.87.6.8563
- Cadas, H., di Tomaso, E., & Piomelli, D. (1997). Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(4), 1226-1242.
- Cardinal, P., Andre, C., Quarta, C., Bellocchio, L., Clark, S., Elie, M., . . . Cota, D. (2014). CB1 cannabinoid receptor in SF1-expressing neurons of the ventromedial hypothalamus determines metabolic responses to diet and leptin. *Molecular Metabolism*, 3(7), 705-716. doi:10.1016/j.molmet.2014.07.004
- Cardinal, P., Bellocchio, L., Clark, S., Cannich, A., Klugmann, M., Lutz, B., . . . Cota, D. (2012). Hypothalamic

- CB1 cannabinoid receptors regulate energy balance in mice. *Endocrinology*, 153(9), 4136-4143.  
doi:10.1210/en.2012-1405
- Catalano, P. M., Farrell, K., Thomas, A., Huston-Presley, L., Mencia, P., de Mouzon, S. H., & Amini, S. B. (2009). Perinatal risk factors for childhood obesity and metabolic dysregulation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(5), 1303-1313. doi:10.3945/ajcn.2008.27416
- Chadwick, B., Miller, M. L., & Hurd, Y. L. (2013). Cannabis use during adolescent development: Susceptibility to psychiatric illness. *Frontiers in Psychiatry*, 4, 129. doi:10.3389/fpsy.2013.00129
- Chakrabarti, B., Kent, L., Suckling, J., Bullmore, E., & Baron-Cohen, S. (2006). Variations in the human cannabinoid receptor (CNR1) gene modulate striatal responses to happy faces. *The European Journal of Neuroscience*, 23(7), 1944-1948. doi:EJN4697
- Chamley, L. W., Bhalla, A., Stone, P. R., Liddell, H., O'Carroll, S., Kearn, C., & Glass, M. (2008). Nuclear localisation of the endocannabinoid metabolizing enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) in invasive trophoblasts and an association with recurrent miscarriage. *Placenta*, 29(11), 970-975. doi:10.1016/j.placenta.2008.08.003
- Chang, Y., Galler, J. R., & Luebke, J. I. (2003). Prenatal protein malnutrition results in increased frequency of miniature inhibitory postsynaptic currents in rat CA3 interneurons. *Nutritional Neuroscience*, 6(4), 263-267. doi:10.1080/1028415031000151549
- Chavatte-Palmer, P., Tarrade, A., & Rousseau-Ralliard, D. (2016). Diet before and during pregnancy and offspring health: The importance of animal models and what can be learned from them. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(6), 10.3390/ijerph13060586. doi:10.3390/ijerph13060586
- Chen, H., Simar, D., & Morris, M. J. (2009). Hypothalamic neuroendocrine circuitry is programmed by maternal obesity: Interaction with postnatal nutritional environment. *PloS One*, 4(7), e6259. doi:10.1371/journal.pone.0006259; 10.1371/journal.pone.0006259
- Chen, H. F., & Su, H. M. (2013). Exposure to a maternal n-3 fatty acid-deficient diet during brain development provokes excessive hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress and behavioral indices of depression and anxiety in male rat offspring later in life. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(1), 70-80. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.02.006
- Clegg, D. J., Brown, L. M., Woods, S. C., & Benoit, S. C. (2006). Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes*, 55(4), 978-987. doi:55/4/978
- Clegg, D. J., Riedy, C. A., Smith, K. A., Benoit, S. C., & Woods, S. C. (2003). Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes*, 52(3), 682-687.
- Cluny, N. L., Baraboi, E. D., Mackie, K., Burdyga, G., Richard, D., Dockray, G. J., & Sharkey, K. A. (2013). High fat diet and body weight have different effects on cannabinoid CB(1) receptor expression in rat nodose ganglia. *Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical*, 179(1-2), 122-130. doi:10.1016/j.autneu.2013.09.015

- Cole, T. J. (2004). Modeling postnatal exposures and their interactions with birth size. *The Journal of Nutrition*, 134(1), 201-204.
- Connan, F., Lightman, S. L., Landau, S., Wheeler, M., Treasure, J., & Campbell, I. C. (2007). An investigation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity in anorexia nervosa: The role of CRH and AVP. *Journal of Psychiatric Research*, 41(1-2), 131-143. doi:S0022-3956(05)00155-X
- Cone, R. D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, 8(5), 571-578. doi:10.1038/nn1455
- Cota, D., Marsicano, G., Tschöp, M., Grubler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., . . . Ortmann, S. (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 112(3), 423-431.
- Cota, D., Steiner, M. A., Marsicano, G., Cervino, C., Herman, J. P., Grubler, Y., . . . Pagotto, U. (2007). Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Endocrinology*, 148(4), 1574-1581. doi:10.1210/en.2005-1649
- Cota, D., Tschöp, M. H., Horvath, T. L., & Levine, A. S. (2006). Cannabinoids, opioids and eating behavior: The molecular face of hedonism? *Brain Research Reviews*, 51(1), 85-107.
- Cote, M., Matias, I., Lemieux, I., Petrosino, S., Almeras, N., Despres, J. P., & Di Marzo, V. (2007). Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *International Journal of Obesity (2005)*, 31(4), 692-699. doi:0803539
- Coupe, B., Amarger, V., Grit, I., Benani, A., & Parnet, P. (2010). Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology*, 151(2), 702-713. doi:10.1210/en.2009-0893
- Coupe, B., Dutriez-Casteloot, I., Breton, C., Lefevre, F., Mairesse, J., Dickes-Coopman, A., . . . Vieau, D. (2009). Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(1), 40-48. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01806.x
- Coupe, B., Grit, I., Darmaun, D., & Parnet, P. (2009). The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. *American Journal of Physiology.Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(3), R813-24. doi:10.1152/ajpregu.00201.2009
- Crane, J. M., White, J., Murphy, P., Burrage, L., & Hutchens, D. (2009). The effect of gestational weight gain by body mass index on maternal and neonatal outcomes. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 31(1), 28-35.
- Crespillo, A., Suarez, J., Bermudez-Silva, F. J., Rivera, P., Vida, M., Alonso, M., . . . Rodriguez de Fonseca, F. (2011). Expression of the cannabinoid system in muscle: Effects of a high-fat diet and CB1 receptor blockade. *The Biochemical Journal*, 433(1), 175-185. doi:10.1042/BJ20100751
- Cristino, L., Becker, T., & Di Marzo, V. (2014). Endocannabinoids and energy homeostasis: An update.

- BioFactors (Oxford, England)*, 40(4), 389-397. doi:10.1002/biof.1168
- Cuervo, M. & Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD). (2010). *Ingestas dietéticas de referencia (IDR) para la población española*. Pamplona. España: Eunsa.
- Cunha Fda, S., Dalle Molle, R., Portella, A. K., Benetti Cda, S., Noschang, C., Goldani, M. Z., & Silveira, P. P. (2015). Both food restriction and high-fat diet during gestation induce low birth weight and altered physical activity in adult rat offspring: The "similarities in the inequalities" model. *PLoS One*, 10(3), e0118586. doi:10.1371/journal.pone.0118586
- Dahlgren, J., Nilsson, C., Jennische, E., Ho, H., Eriksson, E., Niklasson, A., . . . Institute of Physiology and Pharmacology, Dept of Pharmacology. (2001). Prenatal cytokine exposure results in obesity and gender-specific programming. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 281(2), 326-334.
- Dahlhoff, M., Pfister, S., Blutke, A., Rozman, J., Klingenspor, M., Deutsch, M. J., . . . Ensenauer, R. (2014). Peri-conceptual obesogenic exposure induces sex-specific programming of disease susceptibilities in adult mouse offspring. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1842(2), 304-317. doi:10.1016/j.bbadis.2013.11.021
- Das, U. N. (2011). Vagus nerve stimulation as a strategy to prevent and manage metabolic syndrome. *Medical Hypotheses*, 76(3), 429-433. doi:10.1016/j.mehy.2010.11.013
- D'Asti, E., Long, H., Tremblay-Mercier, J., Grajzer, M., Cunnane, S. C., Di Marzo, V., & Walker, C. D. (2010). Maternal dietary fat determines metabolic profile and the magnitude of endocannabinoid inhibition of the stress response in neonatal rat offspring. *Endocrinology*, 151(4), 1685-1694. doi:10.1210/en.2009-1092; 10.1210/en.2009-1092
- De Giuseppe, R., Roggi, C., & Cena, H. (2014). n-3 LC-PUFA supplementation: Effects on infant and maternal outcomes. *European Journal of Nutrition*, 53(5), 1147-1154. doi:10.1007/s00394-014-0660-9
- De Luca, M. A., Solinas, M., Bimpisidis, Z., Goldberg, S. R., & Di Chiara, G. (2012). Cannabinoid facilitation of behavioral and biochemical hedonic taste responses. *Neuropharmacology*, 63(1), 161-168. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.10.018
- de Salas-Quiroga, A., Diaz-Alonso, J., Garcia-Rincon, D., Remmers, F., Vega, D., Gomez-Canas, M., . . . Galve-Roperh, I. (2015). Prenatal exposure to cannabinoids evokes long-lasting functional alterations by targeting CB1 receptors on developing cortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(44), 13693-13698. doi:10.1073/pnas.1514962112
- de Souza, M. A., Szawka, R. E., Centenaro, L. A., Diehl, L. A., & Lucion, A. B. (2012). Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference. *Physiology & Behavior*, 105(3), 850-855. doi:10.1016/j.physbeh.2011.10.012
- Delahaye, F., Breton, C., Risold, P. Y., Enache, M., Dutriez-Casteloot, I., Laborie, C., . . . Vieau, D. (2008). Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups.

*Endocrinology*, 149(2), 470-475. doi:en.2007-1263

- Desai, M., Babu, J., & Ross, M. G. (2007). Programmed metabolic syndrome: Prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. *American Journal of Physiology.Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(6), R2306-14. doi:00783.2006
- Desai, M., Gayle, D., Babu, J., & Ross, M. G. (2005). Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: Modulation by newborn nutrition. *American Journal of Physiology.Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(1), R91-6. doi:10.1152/ajpregu.00340.2004
- Desai, M., Gayle, D., Han, G., & Ross, M. G. (2007). Programmed hyperphagia due to reduced anorexigenic mechanisms in intrauterine growth-restricted offspring *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 14(4), 329-337. doi:14/4/329
- DeVader, S. R., Neeley, H. L., Myles, T. D., & Leet, T. L. (2007). Evaluation of gestational weight gain guidelines for women with normal prepregnancy body mass index. *Obstetrics and Gynecology*, 110(4), 745-751. doi:110/4/745
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., 3rd, Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 34(5), 605-613.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., . . . Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090), 1946-9.
- Di Marzo, V. (2008). CB(1) receptor antagonism: Biological basis for metabolic effects. *Drug Discovery Today*, 13(23-24), 1026-1041. doi:10.1016/j.drudis.2008.09.001
- Di Marzo, V., Goparaju, S. K., Wang, L., Liu, J., Batkai, S., Jarai, Z., . . . Kunos, G. (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, 410(6830), 822-825. doi:10.1038/35071088
- Di Marzo, V., Ligresti, A., & Cristino, L. (2009). The endocannabinoid system as a link between homeostatic and hedonic pathways involved in energy balance regulation. *Int J Obes*, 33(S2), S18-S24.
- Di Marzo, V., & Matias, I. (2005). Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nature Neuroscience*, 8(5), 585-589. doi:10.1038/nn1457
- Di Marzo, V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: To enhance or reduce? *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(5), 438-455. doi:10.1038/nrd2553
- Di Marzo, V., Griinari, M., Carta, G., Murru, E., Ligresti, A., Cordeddu, L., . . . Banni, S. (2010). Dietary krill oil increases docosahexaenoic acid and reduces 2-arachidonoylglycerol but not N-acyl ethanolamine levels in the brain of obese Zucker rats. *International Dairy Journal*, 20(4), 231-235. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.015
- Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Katona, I., Sensi, S. L., . . . Piomelli, D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10819-10824. doi:10.1073/pnas.152334899



- Diouf, I., Charles, M. A., Thiebaugeorges, O., Forhan, A., Kaminski, M., Heude, B., & EDEN Mother-Child Cohort Study Group. (2011). Maternal weight change before pregnancy in relation to birthweight and risks of adverse pregnancy outcomes. *European Journal of Epidemiology*, *26*(10), 789-796. doi:10.1007/s10654-011-9599-9
- DiPatrizio, N. V., & Simansky, K. J. (2008). Activating parabrachial cannabinoid CB1 receptors selectively stimulates feeding of palatable foods in rats. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(39), 9702-9709. doi:10.1523/JNEUROSCI.1171-08.2008
- Doak, C. M., Adair, L. S., Bentley, M., Monteiro, C., & Popkin, B. M. (2005). The dual burden household and the nutrition transition paradox. *International Journal of Obesity (2005)*, *29*(1), 129-136. doi:0802824
- Domschke, K., Dannlowski, U., Ohrmann, P., Lawford, B., Bauer, J., Kugel, H., . . . Baune, B. T. (2008). Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: Impact on antidepressant treatment response and emotion processing in major depression. *European Neuropsychopharmacology : The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, *18*(10), 751-759. doi:10.1016/j.euroneuro.2008.05.003
- Dörner, G. (1975). Perinatal hormone levels and brain organization. In W. E. Stumpf, & L. D. Grant (Eds.). *Anatomical Neuroendocrinology* (pp. 245-252). Basel, Switzerland: Karger.
- Droste, S. M., Saland, S. K., Schlitter, E. K., & Rodefer, J. S. (2010). AM 251 differentially effects food-maintained responding depending on food palatability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *95*(4), 443-448. doi:10.1016/j.pbb.2010.03.005
- Dulloo, A. G., & Jacquet, J. (1998). Adaptive reduction in basal metabolic rate in response to food deprivation in humans: A role for feedback signals from fat stores. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *68*(3), 599.
- Dyall, S. C., Mandhair, H. K., Fincham, R. E., Kerr, D. M., Roche, M., & Molina-Holgado, F. (2016). Distinctive effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in regulating neural stem cell fate are mediated via endocannabinoid signalling pathways. *Neuropharmacology*, *107*, 387-395. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.03.055
- Easter, A., Bye, A., Taborelli, E., Corfield, F., Schmidt, U., Treasure, J., & Micali, N. (2013). Recognising the symptoms: How common are eating disorders in pregnancy? *European Eating Disorders Review : The Journal of the Eating Disorders Association*, *21*(4), 340-344. doi:10.1002/erv.2229
- Ebrahim, S., & Smith, G. D. (1997). Systematic review of randomised controlled trials of multiple risk factor interventions for preventing coronary heart disease. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *314*(7095), 1666-1674.
- Engeli, S., Lehmann, A. C., Kaminski, J., Haas, V., Janke, J., Zoerner, A. A., . . . Jordan, J. (2014). Influence of dietary fat intake on the endocannabinoid system in lean and obese subjects. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *22*(5), E70-6. doi:10.1002/oby.20728
- Erhard, H. W., Boissy, A., Rae, M. T., & Rhind, S. M. (2004). Effects of prenatal undernutrition on emotional reactivity and cognitive flexibility in adult sheep *Behavioural Brain Research*, *151*(1-2), 25-35.

doi:10.1016/j.bbr.2003.08.003

- Eriksson, J. G., Forsen, T., Tuomilehto, J., Jaddoe, V. W., Osmond, C., & Barker, D. J. (2002). Effects of size at birth and childhood growth on the insulin resistance syndrome in elderly individuals. *Diabetologia*, 45(3), 342-348. doi:10.1007/s00125-001-0757-6
- Eriksson, J. G., Forsen, T., Tuomilehto, J., Osmond, C., & Barker, D. J. (2001). Early growth and coronary heart disease in later life: Longitudinal study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 322(7292), 949-953.
- Eriksson, J. G., Osmond, C., Kajantie, E., Forsen, T. J., & Barker, D. J. (2006). Patterns of growth among children who later develop type 2 diabetes or its risk factors. *Diabetologia*, 49(12), 2853-2858. doi:10.1007/s00125-006-0459-1
- European Medicines Agency (EMA) (2009). Assesment report for acomplia. procedure no. EMEA H/C/000666/A20/0012. Retrieved from [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Assessment\\_Report\\_-\\_Variation/human/000666/WC500021280.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Assessment_Report_-_Variation/human/000666/WC500021280.pdf)
- Faa, G., Manchia, M., Pintus, R., Gerosa, C., Marcialis, M. A., & Fanos, V. (2016). Fetal programming of neuropsychiatric disorders. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today : Reviews*, 108(3), 207-223. doi:10.1002/bdrc.21139
- Fernandes, F. S., Tavares do Carmo, M., & Herrera, E. (2012). Influence of maternal diet during early pregnancy on the fatty acid profile in the fetus at late pregnancy in rats. *Lipids*, 47(5), 505-517. doi:10.1007/s11745-012-3660-7 [doi]
- Fernandez-Gonzalez, R., Moreira, P., Bilbao, A., Jimenez, A., Perez-Crespo, M., Ramirez, M. A., . . . Gutierrez-Adan, A. (2004). Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), 5880-5885. doi:10.1073/pnas.0308560101
- Fernandez-Ruiz, J., Berrendero, F., Hernandez, M. L., & Ramos, J. A. (2000). The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends in Neurosciences*, 23(1), 14-20. doi:S0166-2236(99)01491-5
- Fezza, F., Bari, M., Florio, R., Talamonti, E., Feole, M., & Maccarrone, M. (2014). Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(11), 17078-17106. doi:10.3390/molecules191117078
- Filmore, D. (2004). It's a GPCR world. *Modern Drug Discovery*, 7, 24-28. doi:citeulike-article-id:7163793
- Fonseca, B. M., Correia-da-Silva, G., Taylor, A. H., Konje, J. C., Bell, S. C., & Teixeira, N. A. (2009). Spatio-temporal expression patterns of anandamide-binding receptors in rat implantation sites: Evidence for a role of the endocannabinoid system during the period of placental development. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 7, 121-7827-7-121. doi:10.1186/1477-7827-7-121
- Forsdahl, A. (1977). Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *British Journal of Preventive & Social Medicine*, 31(2), 91-95.
- Fraser, A., Tilling, K., Macdonald-Wallis, C., Hughes, R., Sattar, N., Nelson, S. M., & Lawlor, D. A. (2011).

- Associations of gestational weight gain with maternal body mass index, waist circumference, and blood pressure measured 16 y after pregnancy: The avon longitudinal study of parents and children (ALSPAC). *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(6), 1285-1292. doi:10.3945/ajcn.110.008326
- Frazier, C. R., Mason, P., Zhuang, X., & Beeler, J. A. (2008). Sucrose exposure in early life alters adult motivation and weight gain. *PLoS One*, 3(9), e3221. doi:10.1371/journal.pone.0003221
- Freizinger, M., Franko, D. L., Dacey, M., Okun, B., & Domar, A. D. (2010). The prevalence of eating disorders in infertile women. *Fertility and Sterility*, 93(1), 72-78. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.09.055
- Fride, E. (2004). The endocannabinoid-CB receptor system: Importance for development and in pediatric disease. *Neuro Endocrinology Letters*, 25(1-2), 24-30. doi:NEL251204A01
- Fride, E., Foox, A., Rosenberg, E., Faigenboim, M., Cohen, V., Barda, L., . . . Mechoulam, R. (2003). Milk intake and survival in newborn cannabinoid CB1 receptor knockout mice: Evidence for a "CB3" receptor. *European Journal of Pharmacology*, 461(1), 27-34.
- Fride, E., Ginzburg, Y., Breuer, A., Bisogno, T., Di Marzo, V., & Mechoulam, R. (2001). Critical role of the endogenous cannabinoid system in mouse pup suckling and growth. *European Journal of Pharmacology*, 419(2-3), 207-214.
- Friedman, J. M., & Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(6704), 763-770. doi:10.1038/27376
- Frieling, H., Albrecht, H., Jedtberg, S., Gozner, A., Lenz, B., Wilhelm, J., . . . Bleich, S. (2009). Elevated cannabinoid 1 receptor mRNA is linked to eating disorder related behavior and attitudes in females with eating disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 34(4), 620-624. doi:10.1016/j.psyneuen.2008.10.014
- Gabory, A., Ferry, L., Fajardy, I., Jouneau, L., Gothie, J. D., Vige, A., . . . Junien, C. (2012). Maternal diets trigger sex-specific divergent trajectories of gene expression and epigenetic systems in mouse placenta. *PLoS One*, 7(11), e47986. doi:10.1371/journal.pone.0047986
- Gallou-Kabani, C., Gabory, A., Tost, J., Karimi, M., Mayeur, S., Lesage, J., . . . Junien, C. (2010). Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet. *PLoS One*, 5(12), e14398. doi:10.1371/journal.pone.0014398
- Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86(8), 1646-1647.
- Garcia, A. P., Palou, M., Priego, T., Sanchez, J., Palou, A., & Pico, C. (2010). Moderate caloric restriction during gestation results in lower arcuate nucleus NPY- and alphaMSH-neurons and impairs hypothalamic response to fed/fasting conditions in weaned rats *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 12(5), 403-413. doi:10.1111/j.1463-1326.2009.01174.x
- Garg, M. L., Thomson, A. B., & Clandinin, M. T. (1990). Interactions of saturated, n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids to modulate arachidonic acid metabolism. *Journal of Lipid Research*, 31(2),

271-277.

- Georgieff, M. K. (2007). Nutrition and the developing brain: Nutrient priorities and measurement. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(2), 614S-620S. doi:85/2/614S
- Glazer, N. L., Hendrickson, A. F., Schellenbaum, G. D., & Mueller, B. A. (2004). Weight change and the risk of gestational diabetes in obese women. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 15(6), 733-737. doi:00001648-200411000-00013
- Gluckman, P. D., & Hanson, M. A. (2004). The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 15(4), 183-187. doi:10.1016/j.tem.2004.03.002
- Gluckman, P. D., Hanson, M. A., & Low, F. M. (2011). The role of developmental plasticity and epigenetics in human health. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today : Reviews*, 93(1), 12-18. doi:10.1002/bdrc.20198; 10.1002/bdrc.20198
- Godfrey, K. M., Sheppard, A., Gluckman, P. D., Lillycrop, K. A., Burdge, G. C., McLean, C., . . . Hanson, M. A. (2011). Epigenetic gene promoter methylation at birth is associated with child's later adiposity. *Diabetes*, 60(5), 1528-1534. doi:10.2337/db10-0979
- Goldstein, B. J., & Scalia, R. (2004). Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(6), 2563-2568. doi:10.1210/jc.2004-0518
- Gomez, M., Hernandez, M., & Fernandez-Ruiz, J. (2007). The activation of cannabinoid receptors during early postnatal development reduces the expression of cell adhesion molecule L1 in the rat brain. *Brain Research*, 1145, 48-55. doi:S0006-8993(07)00265-X
- Gomez, M., Hernandez, M., & Fernandez-Ruiz, J. (2008). Cannabinoid signaling system: Does it play a function in cell proliferation and migration, neurite elongation and guidance and synaptogenesis during brain ontogenesis? *Cell Adhesion & Migration*, 2(4), 246-248. doi:6749
- Gomez, M., Hernandez, M. L., Pazos, M. R., Tolon, R. M., Romero, J., & Fernandez-Ruiz, J. (2008). Colocalization of CB1 receptors with L1 and GAP-43 in forebrain white matter regions during fetal rat brain development: Evidence for a role of these receptors in axonal growth and guidance. *Neuroscience*, 153(3), 687-699. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.02.038
- Gómez, R., Navarro, M., Ferrer, B., Trigo, J. M., Bilbao, A., Del Arco, I., . . . de Fonseca, F. R. (2002). A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *The Journal of Neuroscience*, 22(21), 9612-9617.
- Gould Rothberg, B. E., Magriples, U., Kershaw, T. S., Rising, S. S., & Ickovics, J. R. (2011). Gestational weight gain and subsequent postpartum weight loss among young, low-income, ethnic minority women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 204(1), 52.e1-52.11. doi:10.1016/j.ajog.2010.08.028
- Gray, C. A., Taylor, K. M., Ramsey, W. S., Hill, J. R., Bazer, F. W., Bartol, F. F., & Spencer, T. E. (2001). Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biology of Reproduction*, 64(6), 1608.
- Gresham, E., Byles, J. E., Bisquera, A., & Hure, A. J. (2014). Effects of dietary interventions on neonatal and

- infant outcomes: A systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100(5), 1298-1321. doi:10.3945/ajcn.113.080655
- Grooten, I., Painter, R., Pontesilli, M., van der Post, J., Mol, B., van Eijsden, M., . . . Roseboom, T. (2014). Weight loss in pregnancy and cardiometabolic profile in childhood: Findings from a longitudinal birth cohort. *BJOG : An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, doi:10.1111/1471-0528.13042
- Grundy, S. M. (2012). Pre-diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Journal of the American College of Cardiology*, 59(7), 635-643. doi:10.1016/j.jacc.2011.08.080
- Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., . . . National Heart, Lung, and Blood Institute. (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An american heart Association/National heart, lung, and blood institute scientific statement. *Circulation*, 112(17), 2735-2752. doi:CIRCULATIONAHA.105.169404
- Guo, F., & Jen, K. L. (1995). High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiology & Behavior*, 57(4), 681-686. doi:0031-9384(94)00342-4
- Guzman, M., Sanchez, C., & Galve-Roperh, I. (2002). Cannabinoids and cell fate. *Pharmacology & Therapeutics*, 95(2), 175-184. doi:S0163725802002565
- Haas, M. J., Mazza, A. D., Wong, N. C., & Mooradian, A. D. (2012). Inhibition of apolipoprotein A-I gene expression by obesity-associated endocannabinoids. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 20(4), 721-729. doi:10.1038/oby.2011.323
- Habayeb, O. M., Taylor, A. H., Evans, M. D., Cooke, M. S., Taylor, D. J., Bell, S. C., & Konje, J. C. (2004). Plasma levels of the endocannabinoid anandamide in women--a potential role in pregnancy maintenance and labor? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(11), 5482-5487. doi:89/11/5482
- Hack, M., Youngstrom, E. A., Cartar, L., Schluchter, M., Taylor, H. G., Flannery, D., . . . Borawski, E. (2004). Behavioral outcomes and evidence of psychopathology among very low birth weight infants at age 20 years. *Pediatrics*, 114(4), 932-940. doi:114/4/932
- Hadar, E., Ashwal, E., & Hod, M. (2015). The preconceptional period as an opportunity for prediction and prevention of noncommunicable disease. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 29(1), 54-62. doi:10.1016/j.bpobgyn.2014.05.011
- Hadley, K. B., Ryan, A. S., Forsyth, S., Gautier, S., & Salem, J., Norman. (2016). The essentiality of arachidonic acid in infant development. *Nutrients*, 8(4), 216. doi:10.3390/nu8040216
- Hales, C. N., & Barker, D. J. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: The thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35(7), 595-601.
- Hales, C. N., & Barker, D. J. (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin*, 60, 5-20.
- Haller, J., Barna, I., Barsvari, B., Gyimesi Pelczer, K., Yasar, S., Panlilio, L. V., & Goldberg, S. (2009). Interactions between environmental aversiveness and the anxiolytic effects of enhanced cannabinoid signaling by FAAH inhibition in rats. *Psychopharmacology*, 204(4), 607-616. doi:10.1007/s00213-009-1494-7

- Hansen, H. S. (2013). Effect of diet on tissue levels of palmitoylethanolamide. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 12(1), 17-25. doi:CDTCNSND-EPUB-20130204-4 [pii]
- Hansen, H. S., & Artmann, A. (2008). Endocannabinoids and nutrition. *Journal of Neuroendocrinology*, 20 Suppl 1, 94-99. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01687.x
- Hansen, H. S., & Diep, T. A. (2009). N-acylethanolamines, anandamide and food intake *Biochemical Pharmacology*, 78(6), 553-560. doi:10.1016/j.bcp.2009.04.024
- Hanus, L., Avraham, Y., Ben-Shushan, D., Zolotarev, O., Berry, E. M., & Mechoulam, R. (2003). Short-term fasting and prolonged semistarvation have opposite effects on 2-AG levels in mouse brain. *Brain Research*, 983(1-2), 144-151. doi:S0006899303030464
- Hao, S., Avraham, Y., Mechoulam, R., & Berry, E. M. (2000). Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. *European Journal of Pharmacology*, 392(3), 147-156. doi:S0014299900000595
- Haring, M., Kaiser, N., Monory, K., & Lutz, B. (2011). Circuit specific functions of cannabinoid CB1 receptor in the balance of investigatory drive and exploration. *PLoS One*, 6(11), e26617. doi:10.1371/journal.pone.0026617; 10.1371/journal.pone.0026617
- Harkany, T., Guzmán, M., Galve-Roperh, I., Berghuis, P., Devi, L. A., & Mackie, K. (2007). The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(2), 83-92. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2006.12.004
- Harkany, T., Keimpema, E., Barabás, K., & Mulder, J. (2008). Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 286(1-2, Supplement 1), S84-S90. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2008.02.011
- Harrison, K., & Marske, A. L. (2005). Nutritional content of foods advertised during the television programs children watch most. *American Journal of Public Health*, 95(9), 1568-1574. doi:95/9/1568
- Harrold, J. A., Elliott, J. C., King, P. J., Widdowson, P. S., & Williams, G. (2002). Down-regulation of cannabinoid-1 (CB-1) receptors in specific extrahypothalamic regions of rats with dietary obesity: A role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food? *Brain Research*, 952(2), 232-238. doi:S0006899302032456
- Helliwell, R. J., Chamley, L. W., Blake-Palmer, K., Mitchell, M. D., Wu, J., Kearns, C. S., & Glass, M. (2004). Characterization of the endocannabinoid system in early human pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(10), 5168-5174. doi:89/10/5168
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., De Costa, B. R., & Rice, K. C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(5), 1932.
- Herrera, E. (2002). Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal Development—A review. *Placenta*, 23, Supplement A(0), S9-S19. doi:http://dx.doi.org/10.1053/plac.2002.0771

- Hill, M. N., Carrier, E. J., McLaughlin, R. J., Morrish, A. C., Meier, S. E., Hillard, C. J., & Gorzalka, B. B. (2008). Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: Effects of concurrent antidepressant treatment. *Journal of Neurochemistry*, *106*(6), 2322-2336. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05567.x
- Hoareau, L., & Roche, R. (2010). Palmitoylethanolamide, adipocytes and obesity-related inflammatory states. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, *7*(3-4), e205-e212. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ddmec.2011.01.002
- Hoek, H. W., Susser, E., Buck, K. A., Lumey, L. H., Lin, S. P., & Gorman, J. M. (1996). Schizoid personality disorder after prenatal exposure to famine. *The American Journal of Psychiatry*, *153*(12), 1637-1639.
- Holemans, K., Caluwaerts, S., Poston, L., & Van Assche, F. A. (2004). Diet-induced obesity in the rat: A model for gestational diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *190*(3), 858-865. doi:10.1016/j.ajog.2003.09.025
- Hons, I. M., Storr, M. A., Mackie, K., Lutz, B., Pittman, Q. J., Mawe, G. M., & Sharkey, K. A. (2012). Plasticity of mouse enteric synapses mediated through endocannabinoid and purinergic signaling. *Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, *24*(3), e113-24. doi:10.1111/j.1365-2982.2011.01860.x
- Horne, A. W., Phillips, J. A., 3rd, Kane, N., Lourenco, P. C., McDonald, S. E., Williams, A. R., . . . Critchley, H. O. (2008). CB1 expression is attenuated in fallopian tube and decidua of women with ectopic pregnancy. *PLoS One*, *3*(12), e3969. doi:10.1371/journal.pone.0003969
- Howie, G. J., Sloboda, D. M., Kamal, T., & Vickers, M. H. (2009). Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *The Journal of Physiology*, *587*(Pt 4), 905-915. doi:10.1113/jphysiol.2008.163477
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., . . . Pertwee, R. G. (2002). International union of pharmacology. XXVII. classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.*, *54*(2), 161-202.
- Huang, D. Y., Lanza, H. I., Wright-Volel, K., & Anglin, M. D. (2013). Developmental trajectories of childhood obesity and risk behaviors in adolescence. *Journal of Adolescence*, *36*(1), 139-148. doi:10.1016/j.adolescence.2012.10.005
- Huizink, A. C., & Mulder, E. J. (2006). Maternal smoking, drinking or cannabis use during pregnancy and neurobehavioral and cognitive functioning in human offspring. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *30*(1), 24-41. doi:S0149-7634(05)00095-3
- Institute of Medicine (2009). *Weight gain during pregnancy; reexamining the guidelines*. Washington, United States: National Academies Press, National Academy of Sciences.
- Institute of Medicine (2005). *Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids*. Washington, United States: National Academies Press, National Academy of Sciences.

- Institute of Medicine (1990). *Nutrition during pregnancy : Part I, weight gain : Part II, nutrient supplements*. Washington. United States: National Academies Press, National Academy of Sciences.
- Inslzco, A. A., & Sharkey, K. A. (2010). Cannabinoids and the gut: New developments and emerging concepts. *Pharmacology & Therapeutics*, 126(1), 21-38.  
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.12.005
- Jamshidi, N., & Taylor, D. A. (2001). Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol.*, 134(6), 1151-4.
- Jehn, M., & Brewis, A. (2009). Paradoxical malnutrition in mother-child pairs: Untangling the phenomenon of over- and under-nutrition in underdeveloped economies. *Economics and Human Biology*, 7(1), 28-35. doi:10.1016/j.ehb.2009.01.007
- Jenniches, I., Ternes, S., Albayram, O., Otte, D. M., Bach, K., Bindila, L., . . . Zimmer, A. (2015). Anxiety, stress, and fear response in mice with reduced endocannabinoid levels. *Biological Psychiatry*, doi:S0006-3223(15)00314-5
- Jimenez-Chillaron, J. C., Hernandez-Valencia, M., Lightner, A., Faucette, R. R., Reamer, C., Przybyla, R., . . . Patti, M. E. (2006). Reductions in caloric intake and early postnatal growth prevent glucose intolerance and obesity associated with low birthweight. *Diabetologia*, 49(8), 1974-1984.  
doi:10.1007/s00125-006-0311-7
- Jimenez-Chillaron, J. C., Hernandez-Valencia, M., Reamer, C., Fisher, S., Joszi, A., Hirshman, M., . . . Patti, M. E. (2005). Beta-cell secretory dysfunction in the pathogenesis of low birth weight-associated diabetes: A murine model. *Diabetes*, 54(3), 702-711. doi:54/3/702
- Jo, Y. H., Chen, Y. J., Chua, S. C., Jr, Talmage, D. A., & Role, L. W. (2005). Integration of endocannabinoid and leptin signaling in an appetite-related neural circuit. *Neuron*, 48(6), 1055-1066. doi:S0896-6273(05)00886-X
- Juan-Pico, P., Fuentes, E., Bermudez-Silva, F. J., Javier Diaz-Molina, F., Ripoll, C., Rodriguez de Fonseca, F., & Nadal, A. (2006). Cannabinoid receptors regulate ca(2+) signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium.*, 39(2), 155-62.
- Kamprath, K., Marsicano, G., Tang, J., Monory, K., Bisogno, T., Di Marzo, V., . . . Wotjak, C. T. (2006). Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(25), 6677-6686. doi:26/25/6677
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto-dani, Y., Uchigashima, M., & Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiological Reviews*, 89(1), 309-380.  
doi:10.1152/physrev.00019.2008; 10.1152/physrev.00019.2008
- Kapadia, M. Z., Park, C. K., Beyene, J., Giglia, L., Maxwell, C., & McDonald, S. D. (2015). Can we safely recommend gestational weight gain below the 2009 guidelines in obese women? A systematic review and meta-analysis *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 16(3), 189-206. doi:10.1111/obr.12238



- Katona, I., & Freund, T. F. (2012). Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 35, 529-558. doi:10.1146/annurev-neuro-062111-150420; 10.1146/annurev-neuro-062111-150420
- Katona, I., Sperl agh, B., S ik, A., K afalvi, A., Vizi, E. S., Mackie, K., & Freund, T. F. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(11), 4544.
- Kaur, J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice*, 2014, 943162. doi:10.1155/2014/943162
- Keimpema, E., Calvigioni, D., & Harkany, T. (2013). Endocannabinoid signals in the developmental programming of delayed-onset neuropsychiatric and metabolic illnesses. *Biochemical Society Transactions*, 41(6), 1569-1576. doi:10.1042/BST20130117; 10.1042/BST20130117
- Keimpema, E., Hokfelt, T., Harkany, T., & Doherty, P. (2014). The molecular interplay between endocannabinoid and neurotrophin signals in the nervous system and beyond. *The European Journal of Neuroscience*, 39(3), 334-343. doi:10.1111/ejn.12431
- Keimpema, E., Mackie, K., & Harkany, T. (2011). Molecular model of cannabis sensitivity in developing neuronal circuits. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(9), 551-561. doi:10.1016/j.tips.2011.05.004
- Kermack, W. O., McKendrick, A. G., & Mckinlay, P. L. (1934). Death-rates in great britain and sweden some general regularities and their significance. *The Lancet*, 223(5770), 698-703. doi:10.1016/S0140-6736(00)92530-3
- Khan, I. Y., Dekou, V., Douglas, G., Jensen, R., Hanson, M. A., Poston, L., & Taylor, P. D. (2005). A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(1), R127-33. doi:10.1152/ajpregu.00354.2004
- Kirk, S. L., Samuelsson, A. M., Argenton, M., Dhonye, H., Kalamatianos, T., Poston, L., . . . Coen, C. W. (2009). Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PloS One*, 4(6), e5870. doi:10.1371/journal.pone.0005870; 10.1371/journal.pone.0005870
- Kirkham, T. C., Williams, C. M., Fezza, F., & Di Marzo, V. (2002). Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: Stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *British Journal of Pharmacology*, 136(4), 550-557. doi:10.1038/sj.bjp.0704767
- Knittle, J. L. (1972). Maternal diet as a factor in adipose tissue cellularity and metabolism in the young rat. *The Journal of Nutrition*, 102(3), 427-434.
- Kola, B., Farkas, I., Christ-Crain, M., Wittmann, G., Lolli, F., Amin, F., . . . Korb onits, M. (2008). The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS One*, 3(3), e1797.

- Koletzko, B. (2005). Developmental origins of adult disease: Barker's or Dorner's hypothesis? *American Journal of Human Biology : The Official Journal of the Human Biology Council*, 17(3), 381-382. doi:10.1002/ajhb.20139
- Koletzko, B., Beyer, J., Brands, B., Demmelmaier, H., Grote, V., Haile, G., . . . European Childhood Obesity Trial Study Group. (2013). Early influences of nutrition on postnatal growth. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 71, 11-27. doi:10.1159/000342533; 10.1159/000342533
- Kondo, S., Kondo, H., Nakane, S., Kodaka, T., Tokumura, A., Waku, K., & Sugiura, T. (1998). 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: Identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA2+-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Letters*, 429(2), 152-156. doi:S0014-5793(98)00581-X
- Korcak, D., Dietl, M., & Steinhäuser, G. (2011). Effectiveness of programmes as part of primary prevention demonstrated on the example of cardiovascular diseases and the metabolic syndrome. *GMS Health Technology Assessment*, 7, Doc02. doi:10.3205/hta000093
- Kuzawa, C. (2005). The origins of the developmental origins hypothesis and the role of postnatal environments: Response to Koletzko. *American Journal of Human Biology : The Official Journal of the Human Biology Council*, 17(5), 662-664. doi:10.1002/ajhb.20421
- Kwong, W. Y., Wild, A. E., Roberts, P., Willis, A. C., & Fleming, T. P. (2000). Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development (Cambridge, England)*, 127(19), 4195-4202.
- Laakso, M. (2004). Gene variants, insulin resistance, and dyslipidaemia. *Current Opinion in Lipidology*, 15(2), 115-120. doi:00041433-200404000-00004
- Lafourcade, M., Larrieu, T., Mato, S., Duffaud, A., Sepers, M., Matias, I., . . . Manzoni, O. J. (2011). Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nature Neuroscience*, 14(3), 345-350. doi:10.1038/nn.2736; 10.1038/nn.2736
- Lamni-Keefe, C. J., Couch, S. C., & Philipson, E. H. (2008). *Handbook of nutrition and pregnancy*. Totowa, NJ: Humana Press. doi:10.1007/978-1-59745-112-3
- Lands, W. E., Libelt, B., Morris, A., Kramer, N. C., Prewitt, T. E., Bowen, P., . . . Burns, J. H. (1992). Maintenance of lower proportions of (n - 6) eicosanoid precursors in phospholipids of human plasma in response to added dietary (n - 3) fatty acids. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1180(2), 147-162. doi:0925-4439(92)90063-S
- Langley-Evans, S. C. (1996). Intrauterine programming of hypertension in the rat: Nutrient interactions. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Physiology*, 114(4), 327-333.
- Langley-Evans, S. C. (2013). Fetal programming of CVD and renal disease: Animal models and mechanistic considerations. *The Proceedings of the Nutrition Society*, , 1-9. doi:10.1017/S0029665112003035
- Langley-Evans, S. C. (2015). Nutrition in early life and the programming of adult disease: A review. *Journal of*

- Human Nutrition and Dietetics*, 28(s1), 1-14. doi:10.1111/jhn.12212
- Langley-Evans, S. C., & Nwagwu, M. (1998). Impaired growth and increased glucocorticoid-sensitive enzyme activities in tissues of rat fetuses exposed to maternal low protein diets. *Life Sciences*, 63(7), 605-615. doi:S0024320598003117
- Larrieu, T., Madore, C., Joffre, C., & Laye, S. (2012). Nutritional n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency alters cannabinoid receptor signaling pathway in the brain and associated anxiety-like behavior in mice. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 68(4), 671-681. doi:10.1007/s13105-012-0179-6; 10.1007/s13105-012-0179-6
- Lee, J. M., Kim, M. J., Kim, M. Y., Han, J. Y., Ahn, H. K., Choi, J. S., . . . Kim, M. H. (2014). Gestational weight gain is an important risk factor for excessive fetal growth. *Obstetrics Gynecology Science*, 57(6), 442-447. doi:10.5468/ogs.2014.57.6.442
- Levay, E. A., Paolini, A. G., Govic, A., Hazi, A., Penman, J., & Kent, S. (2008). Anxiety-like behaviour in adult rats perinatally exposed to maternal calorie restriction *Behavioural Brain Research*, 191(2), 164-172. doi:10.1016/j.bbr.2008.03.021
- Levay, E. A., Paolini, A. G., Govic, A., Hazi, A., Penman, J., & Kent, S. (2010). HPA and sympathoadrenal activity of adult rats perinatally exposed to maternal mild calorie restriction *Behavioural Brain Research*, 208(1), 202-208. doi:10.1016/j.bbr.2009.11.033
- Liang, C., Oest, M. E., & Prater, M. R. (2009). Intrauterine exposure to high saturated fat diet elevates risk of adult-onset chronic diseases in C57BL/6 mice. *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology*, 86(5), 377-384. doi:10.1002/bdrb.20206
- Li, N., Liu, E., Guo, J., Pan, L., Li, B., Wang, P., . . . Hu, G. (2013). Maternal prepregnancy body mass index and gestational weight gain on pregnancy outcomes. *PloS One*, 8(12), e82310. doi:10.1371/journal.pone.0082310
- Lin, S., Khanolkar, A. D., Fan, P., Goutopoulos, A., Qin, C., Papahadjis, D., & Makriyannis, A. (1998). Novel analogues of arachidonylethanolamide (anandamide): Affinities for the CB1 and CB2 cannabinoid receptors and metabolic stability. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(27), 5353-5361. doi:10.1021/jm970257g
- Lindborg, K. A., Teachey, M. K., Jacob, S., & Henriksen, E. J. (2010). Effects of in vitro antagonism of endocannabinoid-1 receptors on the glucose transport system in normal and insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 12(8), 722-730. doi:10.1111/j.1463-1326.2010.01227.x
- Linna, M. S., Raevuori, A., Haukka, J., Suvisaari, J. M., Suokas, J. T., & Gissler, M. (2013). Reproductive health outcomes in eating disorders. *The International Journal of Eating Disorders*, 46(8), 826-833. doi:10.1002/eat.22179
- Linna, M. S., Raevuori, A., Haukka, J., Suvisaari, J. M., Suokas, J. T., & Gissler, M. (2014). Pregnancy, obstetric, and perinatal health outcomes in eating disorders. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*,

211(4), 392.e1-392.e8. doi:10.1016/j.ajog.2014.03.067

- Liu, J., Dong, H., Zhang, Y., Cao, M., Song, L., Pan, Q., . . . Wang, H. (2015). Bilirubin increases insulin sensitivity by regulating cholesterol metabolism, adipokines and PPARgamma levels. *Scientific Reports*, 5, 9886. doi:10.1038/srep09886
- Liu, Y. L., Connoley, I. P., Wilson, C. A., & Stock, M. J. (2005). Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in lep(ob)/Lep(ob) mice. *International Journal of Obesity* (2005), 29(2), 183-187. doi:0802847
- Lopuhaa, C. E., Roseboom, T. J., Osmond, C., Barker, D. J., Ravelli, A. C., Bleker, O. P., . . . van der Meulen, J. H. (2000). Atopy, lung function, and obstructive airways disease after prenatal exposure to famine. *Thorax*, 55(7), 555-561.
- Lucas, A. (1991). Programming by early nutrition in man. *Ciba Foundation Symposium*, 156, 38-50; discussion 50-5.
- Lucas, A. (2005). Long-term programming effects of early nutrition -- implications for the preterm infant. *Journal of Perinatology : Official Journal of the California Perinatal Association*, 25 Suppl 2, S2-6. doi:7211308
- Lucas, C., Charlton, K. E., & Yeatman, H. (2014). Nutrition advice during pregnancy: Do women receive it and can health professionals provide it? *Maternal and Child Health Journal*, 18(10), 2465-2478. doi:10.1007/s10995-014-1485-0
- Lukaszewski, M. A., Mayeur, S., Fajardy, I., Delahaye, F., Dutriez-Casteloot, I., Montel, V., . . . Breton, C. (2011). Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 301(3), E548-59. doi:10.1152/ajpendo.00011.2011
- Lussana, F., Painter, R. C., Ocke, M. C., Buller, H. R., Bossuyt, P. M., & Roseboom, T. J. (2008). Prenatal exposure to the dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(6), 1648-1652. doi:10.3945/ajcn.2008.26140 [doi]
- Lutz, B. (2007). The endocannabinoid system and extinction learning. *Molecular Neurobiology*, 36(1), 92-101. doi:10.1007/s12035-007-8004-x
- Lutz, B. (2009). Endocannabinoid signals in the control of emotion. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(1), 46-52. doi:10.1016/j.coph.2008.12.001; 10.1016/j.coph.2008.12.001
- Lutz, B., Marsicano, G., Maldonado, R., & Hillard, C. J. (2015). The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(12), 705-718. doi:10.1038/nrn4036
- Maccarrone, M., Bab, I., Biro, T., Cabral, G. A., Dey, S. K., Di Marzo, V., . . . Zimmer, A. (2015). Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(5), 277-296. doi:S0165-6147(15)00034-6
- Maccarrone, M., Guzman, M., Mackie, K., Doherty, P., & Harkany, T. (2014). Programming of neural cells by

- (endo)cannabinoids: From physiological rules to emerging therapies. *Nature Reviews.Neuroscience*, 15(12), 786-801. doi:10.1038/nrn3846
- Mackie, K. (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (168)(168), 299-325.
- Mackie, K. (2008). Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 286(1-2 Suppl 1), S60-5. doi:10.1016/j.mce.2008.01.022; 10.1016/j.mce.2008.01.022
- Madore, C., Nadjar, A., Delpech, J. C., Sere, A., Aubert, A., Portal, C., . . . Laye, S. (2014). Nutritional n-3 PUFAs deficiency during perinatal periods alters brain innate immune system and neuronal plasticity-associated genes. *Brain, Behavior, and Immunity*, 41, 22-31. doi:10.1016/j.bbi.2014.03.021
- Malcher-Lopes, R., Di, S., Marcheselli, V. S., Weng, F. J., Stuart, C. T., Bazan, N. G., & Tasker, J. G. (2006). Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(24), 6643-6650. doi:26/24/6643
- Marco, E. M., Perez-Alvarez, L., Borcel, E., Rubio, M., Guaza, C., Ambrosio, E., . . . Viveros, M. P. (2004). Involvement of 5-HT1A receptors in behavioural effects of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in male rats. *Behavioural Pharmacology*, 15(1), 21-27.
- Marcondes, F. K., Miguel, K. J., Melo, L. L., & Spadari-Bratfisch, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology & Behavior*, 74(4), 435-440. doi:10.1016/S0031-9384(01)00593-5
- Marshall, V. A., Johnson, K. J., Moore, N. P., Rasoulpour, R. J., Tornesi, B., & Carney, E. W. (2015). Comparative response of rat and rabbit conceptuses in vitro to inhibitors of histiotrophic nutrition. *Birth Defects Research.Part B, Developmental and Reproductive Toxicology*, 104(1), 1-10. doi:10.1002/bdrb.21134
- Marsicano, G., & Lutz, B. (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *European Journal of Neuroscience*, 11(12), 4213-4225.
- Marsicano, G., & Lutz, B. (2006). Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *Journal of Endocrinological Investigation*, 29(3 Suppl), 27-46.
- Mathes, C. M., Ferrara, M., & Rowland, N. E. (2008). Cannabinoid-1 receptor antagonists reduce caloric intake by decreasing palatable diet selection in a novel dessert protocol in female rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(1), R67-R75. doi:10.1152/ajpregu.00150.2008
- Matias, I., Bisogno, T., & Di Marzo, V. (2006). Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues: Regulation of their levels and control of food intake. *Int J Obes (Lond)*, 30(Suppl 1), S7-S12.
- Matias, I., & Di Marzo, V. (2007). Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 18(1), 27-37. doi:10.1016/j.tem.2006.11.006
- Matias, I., Leonhardt, M., Lesage, J., De Petrocellis, L., Dupouy, J. P., Vieau, D., & Di Marzo, V. (2003). Effect

- of maternal under-nutrition on pup body weight and hypothalamic endocannabinoid levels. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 60(2), 382-389.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284), 561-564.  
doi:10.1038/346561a0
- Mattace Raso, G., Santoro, A., Russo, R., Simeoli, R., Paciello, O., Di Carlo, C., . . . Meli, R. (2014). Palmitoylethanolamide prevents metabolic alterations and restores leptin sensitivity in ovariectomized rats. *Endocrinology*, 155(4), 1291.
- Matusiak, K., Barrett, H. L., Callaway, L. K., & Nitert, M. D. (2014). Periconception weight loss: Common sense for mothers, but what about for babies? *Journal of Obesity*, 2014, 204295.  
doi:10.1155/2014/204295
- Mazier, W., Saucisse, N., Gatta-Cherifi, B., & Cota, D. (2015). The endocannabinoid system: Pivotal orchestrator of obesity and metabolic disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(10), 524-537. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2015.07.007
- McMillen, I. C., MacLaughlin, S. M., Muhlhausler, B. S., Gentili, S., Duffield, J. L., & Morrison, J. L. (2008). Developmental origins of adult health and disease: The role of periconceptional and foetal nutrition. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 102(2), 82-89. doi:10.1111/j.1742-7843.2007.00188.x
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., . . . Compton, D. R. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.*, 50(1), 83-90.
- Metz, T. D., & Stickrath, E. H. (2015). Marijuana use in pregnancy and lactation: A review of the evidence. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, doi:S0002-9378(15)00501-3
- Micali, N., dos-Santos-Silva, I., De Stavola, B., Steenweg-de Graaf, J., Jaddoe, V., Hofman, A., . . . Tiemeier, H. (2014). Fertility treatment, twin births, and unplanned pregnancies in women with eating disorders: Findings from a population-based birth cohort *BJOG : An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 121(4), 408-416. doi:10.1111/1471-0528.12503
- Micali, N., Simonoff, E., & Treasure, J. (2007a). Risk of major adverse perinatal outcomes in women with eating disorders *The British Journal of Psychiatry : The Journal of Mental Science*, 190, 255-259.  
doi:190/3/255
- Micali, N., Treasure, J., & Simonoff, E. (2007). Eating disorders symptoms in pregnancy: A longitudinal study of women with recent and past eating disorders and obesity. *Journal of Psychosomatic Research*, 63(3), 297-303. doi:S0022-3999(07)00207-3
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2015). *Indicadores clave del sistema nacional de salud: INCLASS-base de datos*. Retrieved from  
[http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/inclasSNS\\_DB.htm](http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/inclasSNS_DB.htm)
- Monteleone, P., Matias, I., Martiadis, V., De Petrocellis, L., Maj, M., & Di Marzo, V. (2005). Blood levels of

- the endocannabinoid anandamide are increased in anorexia nervosa and in binge-eating disorder, but not in bulimia nervosa. *Neuropsychopharmacology*, 30(6), 1216-1221. doi:10.1038/sj.npp.1300695
- Moore, K. L., & Persaud, T. V. N. (2008). *Embriologia clinica*. Barcelona, España: Elsevier España
- Morales, P., Hernandez-Folgado, L., Goya, P., & Jagerovic, N. (2016). Cannabinoid receptor 2 (CB2) agonists and antagonists: A patent update. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(7), 843-856. doi:10.1080/13543776.2016.1193157
- Moreno, M., Escuredo, L., Munoz, R., Rodriguez de Fonseca, F., & Navarro, M. (2005). Long-term behavioural and neuroendocrine effects of perinatal activation or blockade of CB1 cannabinoid receptors. *Behavioural Pharmacology*, 16(5-6), 423-430. doi:00008877-200509000-00015
- Morgane, P. J., Mokler, D. J., & Galler, J. R. (2002). *Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation*. United States: Elsevier Ltd. doi:10.1016/S0149-7634(02)00012-X
- Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443(7109), 289-295. doi:10.1038/nature05026
- Mostello, D., Jen Chang, J., Allen, J., Luehr, L., Shyken, J., & Leet, T. (2010). Recurrent preeclampsia: The effect of weight change between pregnancies. *Obstetrics and Gynecology*, 116(3), 667-672. doi:10.1097/AOG.0b013e3181ed74ea
- Motaghedi, R., & McGraw, T. E. (2008). The CB1 endocannabinoid system modulates adipocyte insulin sensitivity. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 16(8), 1727-1734. doi:10.1038/oby.2008.309
- Muhlhausler, B. S., & Ong, Z. Y. (2011). The fetal origins of obesity: Early origins of altered food intake. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 11(3), 189-197. doi:EMID-DT-ABS-78
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), 61-65.
- Naughton, S. S., Mathai, M. L., Hryciw, D. H., & McAinch, A. J. (2013). Fatty acid modulation of the endocannabinoid system and the effect on food intake and metabolism. *International Journal of Endocrinology*, 2013, 361895. doi:10.1155/2013/361895
- Navarro, M., Rubio, P., & de Fonseca, F. R. (1995). Behavioural consequences of maternal exposure to natural cannabinoids in rats. *Psychopharmacology*, 122(1), 1-14.
- Neel, J. V. (1962). Diabetes mellitus: A "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *American Journal of Human Genetics*, 14, 353-362.
- Neel, J. V. (1999). The "thrifty genotype" in 1998. *Nutrition Reviews*, 57(5 Pt 2), S2-9.
- Neu, J., Hauser, N., & Douglas-Escobar, M. (2007). Postnatal nutrition and adult health programming. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 12(1), 78-86. doi:S1744-165X(06)00103-X
- Neugebauer, R., Hoek, H. W., & Susser, E. (1999). Prenatal exposure to wartime famine and development of antisocial personality disorder in early adulthood. *Jama*, 282(5), 455-462. doi:joc90393]
- Niki, M., Jyotaki, M., Yoshida, R., Yasumatsu, K., Shigemura, N., DiPatrizio, N. V., . . . Ninomiya, Y. (2015).

- Modulation of sweet taste sensitivities by endogenous leptin and endocannabinoids in mice. *The Journal of Physiology*, 593(11), 2527-2545. doi:10.1113/JP270295
- Nivoit, P., Morens, C., Van Assche, F. A., Jansen, E., Poston, L., Remacle, C., & Reusens, B. (2009). Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia*, 52(6), 1133-1142. doi:10.1007/s00125-009-1316-9; 10.1007/s00125-009-1316-9
- Nohr, E. A., Vaeth, M., Baker, J. L., Sorensen, T. I., Olsen, J., & Rasmussen, K. M. (2008). Combined associations of prepregnancy body mass index and gestational weight gain with the outcome of pregnancy. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(6), 1750-1759. doi:87/6/1750
- Nomura, Y., Wickramaratne, P. J., Pilowsky, D. J., Newcorn, J. H., Bruder-Costello, B., Davey, C., . . . Weissman, M. M. (2007). Low birth weight and risk of affective disorders and selected medical illness in offspring at high and low risk for depression *Comprehensive Psychiatry*, 48(5), 470-478. doi:S0010-440X(07)00053-3
- Oddi, S., Fezza, F., Pasquariello, N., De Simone, C., Rapino, C., Dainese, E., . . . Maccarrone, M. (2008). Evidence for the intracellular accumulation of anandamide in adiposomes. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 65(5), 840-850. doi:10.1007/s00018-008-7494-7
- Odegaard, J. I., Ricardo-Gonzalez, R. R., Goforth, M. H., Morel, C. R., Subramanian, V., Mukundan, L., . . . Chawla, A. (2007). Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*, 447(7148), 1116-1120. doi:nature05894
- Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gong, J. P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P. A., . . . Uhl, G. R. (2006). Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci*, 1074, 514-36.
- Ong, K. K., & Dunger, D. B. (2002). Perinatal growth failure: The road to obesity, insulin resistance and cardiovascular disease in adults. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 16(2), 191-207. doi:10.1053/beem.2002.0195
- Ong, Z. Y., & Muhlhausler, B. S. (2011). Maternal "junk-food" feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(7), 2167-2179. doi:10.1096/fj.10-178392; 10.1096/fj.10-178392
- Onis, M. d., Ezzati, M., Mathers, C., & Rivera, J. (2008). Maternal and child undernutrition 1: Maternal and child undernutrition: Global and regional exposures and health consequences. *The Lancet*, 371(9608), 243.
- Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Batkai, S., . . . Kunos, G. (2005). Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1298-1305. doi:10.1172/JCI23057
- Ounsted, M. K., Cockburn, J. M., Moar, V. A., & Redman, C. W. (1985). Factors associated with the blood pressures of children born to women who were hypertensive during pregnancy. *Archives of Disease in*



- Childhood*, 60(7), 631-635.
- Owen, C. G., Martin, R. M., Whincup, P. H., Davey-Smith, G., Gillman, M. W., & Cook, D. G. (2005). The effect of breastfeeding on mean body mass index throughout life: A quantitative review of published and unpublished observational evidence. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(6), 1298-1307. doi:82/6/1298
- Pagotto, U., & Pasquali, R. (2006). Endocannabinoids and energy metabolism. *Journal of Endocrinological Investigation*, 29(3), 66.
- Painter, R. C., De Rooij, S. R., Bossuyt, P. M., Osmond, C., Barker, D. J., Bleker, O. P., & Roseboom, T. J. (2006). A possible link between prenatal exposure to famine and breast cancer: A preliminary study. *American Journal of Human Biology : The Official Journal of the Human Biology Council*, 18(6), 853-856. doi:10.1002/ajhb.20564
- Palou, M., Priego, T., Sanchez, J., Palou, A., & Pico, C. (2010). Sexual dimorphism in the lasting effects of moderate caloric restriction during gestation on energy homeostasis in rats is related with fetal programming of insulin and leptin resistance. *Nutrition & Metabolism*, 7, 69-7075-7-69. doi:10.1186/1743-7075-7-69
- Paria, B. C., Song, H., Wang, X., Schmid, P. C., Krebsbach, R. J., Schmid, H. H., . . . Dey, S. K. (2001). Dysregulated cannabinoid signaling disrupts uterine receptivity for embryo implantation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20523-20528. doi:10.1074/jbc.M100679200
- Pasquali, R., Pelusi, C., Genghini, S., Cacciari, M., & Gambineri, A. (2003). Obesity and reproductive disorders in women. *Human Reproduction Update*, 9(4), 359.
- Pasternak, Y., Weintraub, A. Y., Shoham-Vardi, I., Sergienko, R., Guez, J., Wiznitzer, A., . . . Sheiner, E. (2012). Obstetric and perinatal outcomes in women with eating disorders. *Journal of Women's Health (2002)*, 21(1), 61-65. doi:10.1089/jwh.2011.2907
- Patel, M. S., & Srinivasan, M. (2011). Metabolic programming in the immediate postnatal life. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 58 Suppl 2, 18-28. doi:10.1159/000328040
- Patel, S., & Hillard, C. J. (2008). Adaptations in endocannabinoid signaling in response to repeated homotypic stress: A novel mechanism for stress habituation. *The European Journal of Neuroscience*, 27(11), 2821-2829. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06266.x
- Pecina, S., & Berridge, K. C. (2000). Opioid site in nucleus accumbens shell mediates eating and hedonic 'liking' for food: Map based on microinjection fos plumes. *Brain Research*, 863(1-2), 71-86.
- Peleg-Raibstein, D., Luca, E., & Wolfrum, C. (2012). Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. *Behavioural Brain Research*, 233(2), 398-404. doi:10.1016/j.bbr.2012.05.027
- Peregoy, P. L., Zimmermann, R. R., & Strobel, D. A. (1972). Protein preference in protein-malnourished monkeys. *Perceptual and Motor Skills*, 35(2), 495-503. doi:10.2466/pms.1972.35.2.495
- Perrone, S., Santacrose, A., Picardi, A., & Buonocore, G. (2016). Fetal programming and early identification of newborns at high risk of free radical-mediated diseases. *World Journal of Clinical Pediatrics*, 5(2),

172-181. doi:10.5409/wjcp.v5.i2.172

- Perwitz, N., Klein, J., Wenzel, J., Wagner, I., Buening, J., Drenckhan, M., . . . Lehnert, H. (2010). Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 12(2), 158-166. doi:10.1111/j.1463-1326.2009.01133.x
- Pettus, J. P., Geist, C. R., & Schultz, G. E. (1974). Recovery from malnutrition: Food preference and neophobia. *Perceptual and Motor Skills*, 38(3), 767-773. doi:10.2466/pms.1974.38.3.767 [doi]
- Phillips, C. M., & Perry, I. J. (2015). Depressive symptoms, anxiety and well-being among metabolic health obese subtypes. *Psychoneuroendocrinology*, 62, 47-53.  
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.07.168
- Phillips, D. I., Walker, B. R., Reynolds, R. M., Flanagan, D. E., Wood, P. J., Osmond, C., . . . Whorwood, C. B. (2000). Low birth weight predicts elevated plasma cortisol concentrations in adults from 3 populations. *Hypertension*, 35(6), 1301-1306.
- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(11), 873-884.
- Pitkin, R. M. (2007). Folate and neural tube defects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(1), 285S-288S. doi:85/1/285S
- Plagemann, A. (2004). 'Fetal programming' and 'functional teratogenesis': On epigenetic mechanisms and prevention of perinatally acquired lasting health risks. *Journal of Perinatal Medicine*, 32(4), 297-305. doi:10.1515/JPM.2004.055
- Plagemann, A. (2006). Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Hormone Research*, 65 Suppl 3, 83-89. doi:91511
- Pole, J. D., & Dodds, L. A. (1999). Maternal outcomes associated with weight change between pregnancies. *Canadian Journal of Public Health = Revue Canadienne De Sante Publique*, 90(4), 233-236.
- Poore, K. R., Boullin, J. P., Cleal, J. K., Newman, J. P., Noakes, D. E., Hanson, M. A., & Green, L. R. (2010). Sex- and age-specific effects of nutrition in early gestation and early postnatal life on hypothalamo-pituitary-adrenal axis and sympathoadrenal function in adult sheep. *The Journal of Physiology*, 588(Pt 12), 2219-2237. doi:10.1113/jphysiol.2010.187682
- Primeaux, S. D. (2011). QRFP in female rats: Effects on high fat food intake and hypothalamic gene expression across the estrous cycle. *Peptides*, 32(6), 1270-1275. doi:10.1016/j.peptides.2011.03.022
- Pu, S., Eck, P., Jenkins, D. J., Connelly, P. W., Lamarche, B., Kris-Etherton, P. M., . . . Jones, P. J. (2016). Interactions between dietary oil treatments and genetic variants modulate fatty acid ethanolamides in plasma and body weight composition. *The British Journal of Nutrition*, 115(6), 1012-1023. doi:10.1017/S0007114515005425
- Quarta, C., Bellocchio, L., Mancini, G., Mazza, R., Cervino, C., Brulke, L. J., . . . Pagotto, U. (2010). CB(1) signaling in forebrain and sympathetic neurons is a key determinant of endocannabinoid actions on energy balance. *Cell Metabolism*, 11(4), 273-285. doi:10.1016/j.cmet.2010.02.015;

10.1016/j.cmet.2010.02.015

- Rabasa, C., Winsa-Jörnulf, J., Vogel, H., Babaei, C. S., Askevik, K., & Dickson, S. L. (2016). Behavioral consequences of exposure to a high fat diet during the post-weaning period in rats. *Hormones and Behavior, 85*, 56-66. doi:10.1016/j.yhbeh.2016.07.008
- Rana, J. S., Nieuwdorp, M., Jukema, J. W., & Kastelein, J. J. P. (2007). Cardiovascular metabolic syndrome – an interplay of, obesity, inflammation, diabetes and coronary heart disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism, 9*(3), 218-232. doi:10.1111/j.1463-1326.2006.00594.x
- Rasmussen, K. M., & Kjolhede, C. L. (2004). Prepregnant overweight and obesity diminish the prolactin response to suckling in the first week postpartum. *Pediatrics, 113*(5), e465-71.
- Ravelli, A. C., van Der Meulen, J. H., Osmond, C., Barker, D. J., & Bleker, O. P. (1999). Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *The American Journal of Clinical Nutrition, 70*(5), 811-816.
- Ravelli, G. P., Stein, Z. A., & Susser, M. W. (1976). Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *The New England Journal of Medicine, 295*(7), 349-353. doi:10.1056/NEJM197608122950701
- Ravinet Trillou, C., Delgorge, C., Menet, C., Arnone, M., & Soubrie, P. (2004). CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity, 28*(4), 640-648. doi:10.1038/sj.ijo.0802583
- Reilly, J. J., & Kelly, J. (2011). Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood: Systematic review. *International Journal of Obesity (2005), 35*(7), 891-898. doi:10.1038/ijo.2010.222
- Remmers, F., & Delemarre-van de Waal, H. A. (2011). Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. *Endocrine Reviews, 32*(2), 272-311. doi:10.1210/er.2009-0028
- Reyes-Castro, L. A., Rodriguez, J. S., Charco, R., Bautista, C. J., Larrea, F., Nathanielsz, P. W., & Zambrano, E. (2012). Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience, 30*(1), 39-45. doi:10.1016/j.ijdevneu.2011.10.002
- Reyes-Castro, L. A., Rodriguez, J. S., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Chavira, R., Bautista, C. J., McDonald, T. J., . . . Zambrano, E. (2012). Pre- and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats. *Behavioural Brain Research, 227*(2), 324-329. doi:10.1016/j.bbr.2011.06.008
- Reyes-Castro, L. A., Rodriguez, J. S., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Wimmer, R. D., McDonald, T. J., Larrea, F., . . . Zambrano, E. (2011). Pre- and/or postnatal protein restriction in rats impairs learning and motivation in male offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the*

*International Society for Developmental Neuroscience*, 29(2), 177-182.

doi:10.1016/j.ijdevneu.2010.11.002

Reynolds, C. M., Li, M., Gray, C., & Vickers, M. H. (2014). Early-life growth hormone treatment to offspring of undernourished mothers alters metabolic parameters in primary adipocytes in adulthood. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 32(1), 34-40. doi:10.3109/08977194.2013.870169

Richardson, L. R., Godwin, J., Wilkes, S., & Cannon, M. (1964). Reproductive performance of rats receiving various levels of dietary protein and fat. *The Journal of Nutrition*, 82, 257-262.

Rivera, P., Luque-Rojas, M. J., Pastor, A., Blanco, E., Pavón, F. J., Serrano, A., . . . Suárez, J. (2012). Diet-dependent modulation of hippocampal expression of endocannabinoid signaling-related proteins in cannabinoid antagonist-treated obese rats. *European Journal of Neuroscience*, , n/a-n/a.

doi:10.1111/ejn.12012

Rkhezay-Jaf, J., O'Dowd, J. F., & Stocker, C. J. (2012). Maternal obesity and the fetal origins of the metabolic syndrome *Current Cardiovascular Risk Reports*, 6(5), 487-495. doi:10.1007/s12170-012-0257-x

Robinson, S. M., Crozier, S. R., Harvey, N. C., Barton, B. D., Law, C. M., Godfrey, K. M., . . . Inskip, H. M. (2015). Modifiable early-life risk factors for childhood adiposity and overweight: An analysis of their combined impact and potential for prevention. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101(2), 368-375. doi:10.3945/ajcn.114.094268

Rodriguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Fernandez-Ruiz, J. J., Navarro, M., & Ramos, J. A. (1991). Effects of pre- and perinatal exposure to hashish extracts on the ontogeny of brain dopaminergic neurons. *Neuroscience*, 43(2-3), 713-723.

Rodriguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Ramos, J. A., Martin, M., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1994). Cannabinoid receptors in rat brain areas: Sexual differences, fluctuations during estrous cycle and changes after gonadectomy and sex steroid replacement. *Life Sciences*, 54(3), 159-170.

Rodriguez de Fonseca, F., Navarro, M., Gomez, R., Escuredo, L., Nava, F., Fu, J., . . . Piomelli, D. (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*, 414(6860), 209-212. doi:10.1038/35102582

Rogers, L. K., Valentine, C. J., & Keim, S. A. (2013). DHA supplementation: Current implications in pregnancy and childhood. *Pharmacological Research*, 70(1), 13-19. doi:10.1016/j.phrs.2012.12.003

Rolland-Cachera, M. F., Deheeger, M., Akrou, M., & Bellisle, F. (1995). Influence of macronutrients on adiposity development: A follow up study of nutrition and growth from 10 months to 8 years of age. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 19(8), 573-578.

Rolland-Cachera, M. F., Maillot, M., Deheeger, M., Souberbielle, J. C., Peneau, S., & Hercberg, S. (2013). Association of nutrition in early life with body fat and serum leptin at adult age. *International Journal of Obesity (2005)*, 37(8), 1116-1122. doi:10.1038/ijo.2012.185

Romero, J., Garcia-Palomero, E., Berrendero, F., Garcia-Gil, L., Hernandez, M. L., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1997). Atypical location of cannabinoid receptors in white matter areas during rat brain

- development. *Synapse (New York, N.Y.)*, 26(3), 317-323. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(199707)26:3<317::AID-SYN12>3.0.CO;2-S
- Romero-Zerbo, S. Y., Garcia-Gutierrez, M. S., Suarez, J., Rivera, P., Ruz-Maldonado, I., Vida, M., . . . Bermudez-Silva, F. J. (2012). Overexpression of cannabinoid CB2 receptor in the brain induces hyperglycaemia and a lean phenotype in adult mice. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(8), 1106-1119. doi:10.1111/j.1365-2826.2012.02325.x
- Roseboom, T. J. (2000). *Prenatal exposure to the dutch famine and health in later life* Amsterdam.
- Roseboom, T., de Rooij, S., & Painter, R. (2006). The dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Human Development*, 82(8), 485-491. doi:S0378-3782(06)00184-8
- Roseboom, T. J., van der Meulen, J. H., Osmond, C., Barker, D. J., Ravelli, A. C., & Bleker, O. P. (2000). Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the dutch famine. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(5), 1101-1106.
- Roseboom, T. J., van der Meulen, J. H., Osmond, C., Barker, D. J., Ravelli, A. C., Schroeder-Tanka, J. M., . . . Bleker, O. P. (2000). Coronary heart disease after prenatal exposure to the dutch famine, 1944-45. *Heart (British Cardiac Society)*, 84(6), 595-598.
- Routh, V. H., Hao, L., Santiago, A. M., Sheng, Z., & Zhou, C. (2014). Hypothalamic glucose sensing: Making ends meet. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8, 236. doi:10.3389/fnsys.2014.00236 [doi]
- Rubino, T., Realini, N., Castiglioni, C., Guidali, C., Vigano, D., Marras, E., . . . Parolaro, D. (2008). Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 18(6), 1292-1301. doi:bhm161
- Rubio, P., Rodriguez de Fonseca, F., Martin-Calderon, J. L., Del Arco, I., Bartolome, S., Villanua, M. A., & Navarro, M. (1998). Maternal exposure to low doses of delta9-tetrahydrocannabinol facilitates morphine-induced place conditioning in adult male offspring. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 61(3), 229-238. doi:S0091305798000999
- Rubio, P., Rodriguez de Fonseca, F., Munoz, R. M., Ariznavarreta, C., Martin-Calderon, J. L., & Navarro, M. (1995). Long-term behavioral effects of perinatal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol in rats: Possible role of pituitary-adrenal axis. *Life Sciences*, 56(23-24), 2169-2176.
- Ruehle, S., Remmers, F., Romo-Parra, H., Massa, F., Wickert, M., Wortge, S., . . . Lutz, B. (2013). Cannabinoid CB1 receptor in dorsal telencephalic glutamatergic neurons: Distinctive sufficiency for hippocampus-dependent and amygdala-dependent synaptic and behavioral functions. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(25), 10264-10277. doi:10.1523/JNEUROSCI.4171-12.2013; 10.1523/JNEUROSCI.4171-12.2013
- Sadler, T. W. (2006). *Langman fundamentos de embriología médica*. Madrid, España: Editorial médica Panamericana.
- Samuelsson, A. M., Matthews, P. A., Argenton, M., Christie, M. R., McConnell, J. M., Jansen, E. H., . . . Taylor, P. D. (2008). Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity,

- hypertension, and insulin resistance: A novel murine model of developmental programming. *Hypertension*, 51(2), 383-392. doi:HYPERTENSIONAHA.107.101477
- Sanchis-Segura, C., Cline, B. H., Marsicano, G., Lutz, B., & Spanagel, R. (2004). Reduced sensitivity to reward in CB1 knockout mice. *Psychopharmacology (Berl.)*, 176(2), 223-32. Epub 2004 Apr 9.
- Sasaki, A., de Vega, W. C., St-Cyr, S., Pan, P., & McGowan, P. O. (2013). Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. *Neuroscience*, 240, 1-12. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.02.044
- Sasaki, T. (2015). Age-associated weight gain, leptin, and SIRT1: A possible role for hypothalamic SIRT1 in the prevention of weight gain and aging through modulation of leptin sensitivity. *Frontiers in Endocrinology*, 6, 109. doi:10.3389/fendo.2015.00109
- Schwarz, J. M., Hutchinson, M. R., & Bilbo, S. D. (2011). Early-life experience decreases drug-induced reinstatement of morphine CPP in adulthood via microglial-specific epigenetic programming of anti-inflammatory IL-10 expression. *The Journal of Neuroscience*, 31(49), 17835-17847. doi:10.1523/JNEUROSCI.3297-11.2011
- Scott, C., Andersen, C. T., Valdez, N., Mardones, F., Nohr, E. A., Poston, L., . . . Abrams, B. (2014). No global consensus: A cross-sectional survey of maternal weight policies. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 14, 167-2393-14-167. doi:10.1186/1471-2393-14-167
- Sebert, S. P., Hyatt, M. A., Chan, L. L., Patel, N., Bell, R. C., Keisler, D., . . . Gardner, D. S. (2009). Maternal nutrient restriction between early and midgestation and its impact upon appetite regulation after juvenile obesity. *Endocrinology*, 150(2), 634-641. doi:10.1210/en.2008-0542
- Seoane-Collazo, P., Ferno, J., Gonzalez, F., Dieguez, C., Leis, R., Nogueiras, R., & Lopez, M. (2015). Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine*, 50(2), 276-291. doi:10.1007/s12020-015-0658-y
- Serrano, A., Decara, J. M., Fernandez-Gonzalez, R., Lopez-Cardona, A. P., Pavon, F. J., Orio, L., . . . de Fonseca, F. R. (2014). Hyperplastic obesity and liver steatosis as long-term consequences of suboptimal in vitro culture of mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 91(2), 30. doi:10.1095/biolreprod.114.117879
- Shankar, K., Harrell, A., Liu, X., Gilchrist, J. M., Ronis, M. J., & Badger, T. M. (2008). Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(2), R528-38. doi:00316.2007
- Silvestri, C., & Di Marzo, V. (2013). The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metabolism*, 17(4), 475-490. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.001
- Simas, T. A., Waring, M. E., Liao, X., Garrison, A., Sullivan, G. M., Howard, A. E., & Hardy, J. R. (2012). Prepregnancy weight, gestational weight gain, and risk of growth affected neonates. *Journal of Women's Health (2002)*, 21(4), 410-417. doi:10.1089/jwh.2011.2810

- Singhal, A., Farooqi, I. S., O'Rahilly, S., Cole, T. J., Fewtrell, M., & Lucas, A. (2002). Early nutrition and leptin concentrations in later life. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *75*(6), 993-999.
- Singhal, A., Fewtrell, M., Cole, T. J., & Lucas, A. (2003). Low nutrient intake and early growth for later insulin resistance in adolescents born preterm. *Lancet*, *361*(9363), 1089-1097. doi:S0140-6736(03)12895-4
- Sloan, S., Gildea, A., Stewart, M., Sneddon, H., & Iwaniec, D. (2008). Early weaning is related to weight and rate of weight gain in infancy. *Child: Care, Health and Development*, *34*(1), 59-64. doi:10.1111/j.1365-2214.2007.00771.x
- Soria-Gomez, E., Bellocchio, L., Reguero, L., Lepousez, G., Martin, C., Bendahmane, M., . . . Marsicano, G. (2014). The endocannabinoid system controls food intake via olfactory processes. *Nature Neuroscience*, *17*(3), 407-415. doi:10.1038/nn.3647
- Soria-Gomez, E., Massa, F., Bellocchio, L., Rueda-Orozco, P. E., Ciofi, P., Cota, D., . . . Marsicano, G. (2014). Cannabinoid type-1 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibit stimulated food intake. *Neuroscience*, *263*, 46-53. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.01.005
- Srinivasan, M., Katewa, S. D., Palaniyappan, A., Pandya, J. D., & Patel, M. S. (2006). Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *291*(4), E792-9. doi:00078.2006
- Srinivasan, M., Mitrani, P., Sadhanandan, G., Dodds, C., Shbeir-ElDika, S., Thamotharan, S., . . . Patel, M. S. (2008). A high-carbohydrate diet in the immediate postnatal life of rats induces adaptations predisposing to adult-onset obesity. *The Journal of Endocrinology*, *197*(3), 565-574. doi:10.1677/JOE-08-0021
- Stanner, S. A., Bulmer, K., Andres, C., Lantseva, O. E., Borodina, V., Poteen, V. V., & Yudkin, J. S. (1997). Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? results from the leningrad siege study, a cross sectional study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *315*(7119), 1342-1348.
- Starowicz, K. M., Cristino, L., Matias, I., Capasso, R., Racioppi, A., Izzo, A. A., & Di Marzo, V. (2008). Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *16*(3), 553-565. doi:10.1038/oby.2007.106
- Steindel, F., Lerner, R., Haring, M., Ruehle, S., Marsicano, G., Lutz, B., & Monory, K. (2013). Neuron-type specific cannabinoid-mediated G protein signalling in mouse hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, *124*(6), 795-807. doi:10.1111/jnc.12137; 10.1111/jnc.12137
- Steiner, M. A., & Wotjak, C. T. (2008). Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in Brain Research*, *170*, 397-432. doi:10.1016/S0079-6123(08)00433-0
- Stensland, S. O., Thoresen, S., Wentzel-Larsen, T., & Dyb, G. (2015). Interpersonal violence and overweight in adolescents: The HUNT study. *Scandinavian Journal of Public Health*, *43*(1), 18-26. doi:10.1177/1403494814556176

- Stettler, N., Zemel, B. S., Kumanyika, S., & Stallings, V. A. (2002). Infant weight gain and childhood overweight status in a multicenter, cohort study. *Pediatrics*, *109*(2), 194-199.
- Stotland, N. E., Hopkins, L. M., & Caughey, A. B. (2004). Gestational weight gain, macrosomia, and risk of cesarean birth in nondiabetic nulliparas. *Obstetrics and Gynecology*, *104*(4), 671-677.  
doi:10.1097/01.AOG.0000139515.97799.f6
- Stunkard, A. J., Faith, M. S., & Allison, K. C. (2003). Depression and obesity. *Biological Psychiatry*, *54*(3), 330-337. doi:S0006322303006085
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., . . . Waku, K. (1995). 2-arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *215*(1), 89-97.
- Sulcova, E., Mechoulam, R., & Fride, E. (1998). Biphasic effects of anandamide. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *59*(2), 347-352.
- Sullivan, E. L., Grayson, B., Takahashi, D., Robertson, N., Maier, A., Bethea, C. L., . . . Grove, K. L. (2010). Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(10), 3826-3830.  
doi:10.1523/JNEUROSCI.5560-09.2010
- Sullivan, E. L., Nousen, E. K., & Chamlou, K. A. (2014). Maternal high fat diet consumption during the perinatal period programs offspring behavior. *Physiology & Behavior*, *123*, 236-242.  
doi:10.1016/j.physbeh.2012.07.014
- Sun, X., Xie, H., Yang, J., Wang, H., Bradshaw, H. B., & Dey, S. K. (2010). Endocannabinoid signaling directs differentiation of trophoblast cell lineages and placentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(39), 16887-16892. doi:10.1073/pnas.1010892107
- Sun, Y. X., Tsuboi, K., Okamoto, Y., Tonai, T., Murakami, M., Kudo, I., & Ueda, N. (2004). Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochemical Journal*, *380*(Pt 3), 749.
- Susser, M., & Levin, B. (1999). Ordeals for the fetal programming hypothesis. the hypothesis largely survives one ordeal but not another. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *318*(7188), 885-886.
- Suzuki, K., Jayasena, C. N., & Bloom, S. R. (2011). The gut hormones in appetite regulation. *Journal of Obesity*, *2011*, 528401. doi:10.1155/2011/528401
- Tarry-Adkins, J. L., & Ozanne, S. E. (2011). Mechanisms of early life programming: Current knowledge and future directions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *94*(6 Suppl), 1765S-1771S.  
doi:10.3945/ajcn.110.000620
- Taschler, U., Radner, F. P., Heier, C., Schreiber, R., Schweiger, M., Schoiswohl, G., . . . Zimmermann, R. (2011). Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(20), 17467-17477. doi:10.1074/jbc.M110.215434



- Taylor, P. D., & Poston, L. (2007). Developmental programming of obesity in mammals. *Experimental Physiology*, 92(2), 287-298. doi:expphysiol.2005.032854
- Terry, K. K., Chatman, L. A., Foley, G. L., Kadyszewski, E., Fleeman, T. L., Hurtt, M. E., & Chapin, R. E. (2005). Effects of feed restriction on fertility in female rats. *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology*, 74(5), 431-441. doi:10.1002/bdrb.20060
- Thanos, P. K., Ramalhete, R. C., Michaelides, M., Piyis, Y. K., Wang, G. J., & Volkow, N. D. (2008). Leptin receptor deficiency is associated with upregulation of cannabinoid 1 receptors in limbic brain regions. *Synapse (New York, N.Y.)*, 62(9), 637-642. doi:10.1002/syn.20531
- Theys, N., Ahn, M. T., Bouckennooghe, T., Reusens, B., & Remacle, C. (2011). Maternal malnutrition programs pancreatic islet mitochondrial dysfunction in the adult offspring. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(10), 985-994. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.08.015
- Thorsdottir, I., Torfadottir, J. E., Birgisdottir, B. E., & Geirsson, R. T. (2002). Weight gain in women of normal weight before pregnancy: Complications in pregnancy or delivery and birth outcome. *Obstetrics and Gynecology*, 99(5 Pt 1), 799-806. doi:S0029784402019464
- Tibirica, E. (2010). The multiple functions of the endocannabinoid system: A focus on the regulation of food intake. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 2, 5-5996-2-5. doi:10.1186/1758-5996-2-5
- Timofeeva, E., Baraboi, E. D., Poulin, A. M., & Richard, D. (2009). Palatable high-energy diet decreases the expression of cannabinoid type 1 receptor messenger RNA in specific brain regions in the rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(12), 982-992. doi:10.1111/j.1365-2826.2009.01921.x
- Toschke, A. M., Grote, V., Koletzko, B., & von Kries, R. (2004). Identifying children at high risk for overweight at school entry by weight gain during the first 2 years. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 158(5), 449-452. doi:10.1001/archpedi.158.5.449
- Tourino, C., Oveisi, F., Lockney, J., Piomelli, D., & Maldonado, R. (2010). FAAH deficiency promotes energy storage and enhances the motivation for food. *International Journal of Obesity (2005)*, 34(3), 557-568. doi:10.1038/ijo.2009.262
- Treasure, J. L., & Russell, G. F. (1988). Intrauterine growth and neonatal weight gain in babies of women with anorexia nervosa. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 296(6628), 1038.
- Trezza, V., Campolongo, P., Manduca, A., Morena, M., Palmery, M., Vanderschuren, L. J., & Cuomo, V. (2012). Altering endocannabinoid neurotransmission at critical developmental ages: Impact on rodent emotionality and cognitive performance. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 2. doi:10.3389/fnbeh.2012.00002
- van Dijk, S. J., Zhou, J., Peters, T. J., Buckley, M., Sutcliffe, B., Oytam, Y., . . . Muhlhausler, B. S. (2016). Effect of prenatal DHA supplementation on the infant epigenome: Results from a randomized controlled trial. *Clinical Epigenetics*, 8, 114. doi:10.1186/s13148-016-0281-7
- Vanbuskirk, K. A., & Potenza, M. N. (2010). The treatment of obesity and its co-occurrence with substance use disorders. *Journal of Addiction Medicine*, 4(1), 1-10. doi:10.1097/ADM.0b013e3181ce38e7

- Vattikuti, S., Guo, J., & Chow, C. C. (2012). Heritability and genetic correlations explained by common SNPs for metabolic syndrome traits. *PLoS Genetics*, 8(3), e1002637. doi:10.1371/journal.pgen.1002637
- Verty, A. N., Stefanidis, A., McAinch, A. J., Hryciw, D. H., & Oldfield, B. (2015). Anti-obesity effect of the CB2 receptor agonist JWH-015 in diet-induced obese mice. *PLoS One*, 10(11), e0140592. doi:10.1371/journal.pone.0140592
- 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. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 279(1), E83-7.
- Vida, M., Rivera, P., Gavito, A. L., Suarez, J., Pavon, F. J., Arrabal, S., . . . Baixeras, E. (2014). CB1 blockade potentiates down-regulation of lipogenic gene expression in perirenal adipose tissue in high carbohydrate diet-induced obesity. *PLoS One*, 9(2), e90016. doi:10.1371/journal.pone.0090016
- Vilela, L. R., Gobira, P. H., Viana, T. G., Medeiros, D. C., Ferreira-Vieira, T. H., Doria, J. G., . . . Moreira, F. A. (2015). Enhancement of endocannabinoid signaling protects against cocaine-induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 286(3), 178-187. doi:10.1016/j.taap.2015.04.013
- Villar, J., Merialdi, M., Gulmezoglu, A. M., Abalos, E., Carroli, G., Kulier, R., & de Onis, M. (2003). Nutritional interventions during pregnancy for the prevention or treatment of maternal morbidity and preterm delivery: An overview of randomized controlled trials. *The Journal of Nutrition*, 133(5 Suppl 2), 1606S-1625S.
- Viveros, M. P., Marco, E. M., & File, S. E. (2005). Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 81(2), 331-342. doi:10.1016/j.pbb.2005.01.029
- von Kries, R., Koletzko, B., Sauerwald, T., von Mutius, E., Barnert, D., Grunert, V., & von Voss, H. (1999). Breast feeding and obesity: Cross sectional study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 319(7203), 147-150.
- Vucetic, Z., Kimmel, J., & Reyes, T. M. (2011). Chronic high-fat diet drives postnatal epigenetic regulation of mu-opioid receptor in the brain. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 36(6), 1199-1206. doi:10.1038/npp.2011.4
- Vucetic, Z., Kimmel, J., Totoki, K., Hollenbeck, E., & Reyes, T. M. (2010). Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. *Endocrinology*, 151(10), 4756-4764. doi:10.1210/en.2010-0505
- Vujic, N., Schlager, S., Eichmann, T. O., Madreiter-Sokolowski, C. T., Goeritzer, M., Rainer, S., . . . Kratky, D. (2016). Monoglyceride lipase deficiency modulates endocannabinoid signaling and improves plaque stability in ApoE-knockout mice. *Atherosclerosis*, 244, 9-21. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.109
- Wachs, T. D., Georgieff, M., Cusick, S., & McEwen, B. S. (2014). Issues in the timing of integrated early interventions: Contributions from nutrition, neuroscience, and psychological research. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1308, 89.
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322-328. doi:nprot.2007.44

- Walker, C. D. (2005). Nutritional aspects modulating brain development and the responses to stress in early neonatal life. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *29*(8), 1249-1263. doi:S0278-5846(05)00273-3
- Wang, H., Guo, Y., Wang, D., Kingsley, P. J., Marnett, L. J., Das, S. K., . . . Dey, S. K. (2004). Aberrant cannabinoid signaling impairs oviductal transport of embryos. *Nature Medicine*, *10*(10), 1074-1080. doi:10.1038/nm1104
- Wang, H., Xie, H., & Dey, S. K. (2008). Loss of cannabinoid receptor CB1 induces preterm birth. *PLoS One*, *3*(10), e3320. doi:10.1371/journal.pone.0003320
- Wang, X., Athayde, N., & Trudinger, B. (2003). A proinflammatory cytokine response is present in the fetal placental vasculature in placental insufficiency. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *189*(5), 1445-1451. doi:10.1067/S0002-9378(03)00652-5
- Watanabe, S., Doshi, M., & Hamazaki, T. (2003). n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) deficiency elevates and n-3 PUFA enrichment reduces brain 2-arachidonoylglycerol level in mice. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, *69*(1), 51-59. doi:S0952327803000565
- Watkins, A. J., Platt, D., Papenbrock, T., Wilkins, A., Eckert, J. J., Kwong, W. Y., . . . Fleming, T. P. (2007). Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype including raised systolic blood pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(13), 5449-5454. doi:0610317104
- White, C. L., Purpera, M. N., & Morrison, C. D. (2009). Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *296*(5), R1464-72. doi:10.1152/ajpregu.91015.2008
- Wiley, J. L., Burston, J. J., Leggett, D. C., Alekseeva, O. O., Razdan, R. K., Mahadevan, A., & Martin, B. R. (2005). CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *British Journal of Pharmacology*, *145*(3), 293-300. doi:10.1038/sj.bjp.0706157
- Williams, C. M., & Kirkham, T. C. (1999). Anandamide induces overeating: Mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology*, *143*(3), 315-317.
- Williams, C. M., Rogers, P. J., & Kirkham, T. C. (1998). Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta9-THC. *Physiology & Behavior*, *65*(2), 343-346. doi:S0031-9384(98)00170-X
- Williams, J., Wake, M., Hesketh, K., Maher, E., & Waters, E. (2005). Health-related quality of life of overweight and obese children. *Jama*, *293*(1), 70-76. doi:293/1/70
- Wilson, R. I., & Nicoll, R. A. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, *410*(6828), 588-592. doi:10.1038/35069076
- Wood, J. T., Williams, J. S., Pandarinathan, L., Janero, D. R., Lammi-Keefe, C. J., & Makriyannis, A. (2010). Dietary docosahexaenoic acid supplementation alters select physiological endocannabinoid-system metabolites in brain and plasma. *Journal of Lipid Research*, *51*(6), 1416-1423. doi:10.1194/jlr.M002436 [

- World Health Organization (2004). In Ezzati M., Lopez A. D., Rodger A. and Murray C. (Eds.), *Comparative quantification of health risks: Global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors*. Geneva. Switzerland: WHO Press.
- World Health Organization (2013). *Essential nutrition actions: improving maternal, newborn, infant and young health and nutrition*. Geneva. Switzerland: WHO Press.
- World Health Organization (2014). *Global status report of noncommunicable diseases 2014*. Geneva. Switzerland: WHO Press..
- Wright, T., Langley-Evans, S. C., & Voigt, J. P. (2011). The impact of maternal cafeteria diet on anxiety-related behaviour and exploration in the offspring. *Physiology & Behavior*, *103*(2), 164-172. doi:10.1016/j.physbeh.2011.01.008
- Wu, C. S., Morgan, D., Jew, C. P., Haskins, C., Andrews, M. J., Leishman, E., . . . Lu, H. C. (2014). Long-term consequences of perinatal fatty acid amino hydrolase inhibition. *British Journal of Pharmacology*, *171*(6), 1420-1434. doi:10.1111/bph.12500
- Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B., & Bloom, S. (2005). Appetite control. *The Journal of Endocrinology*, *184*(2), 291-318. doi:184/2/291
- Yoshida, R., Ohkuri, T., Jyotaki, M., Yasuo, T., Horio, N., Yasumatsu, K., . . . Margolskee, R. F. (2010). Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(2), 935-939.
- Yura, S., Itoh, H., Sagawa, N., Yamamoto, H., Masuzaki, H., Nakao, K., . . . Fujii, S. (2005). Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metabolism*, *1*(6), 371-378. doi:S1550-4131(05)00143-9
- Zaadstra, B. M., Seidell, J. C., Paul A. H. Van Noord, Egbert R. Te Velde, J. Dik F. Habbema, Vrieswijk, B., & Karbaat, J. (1993). Fat and female fecundity: Prospective study of effect of body fat distribution on conception rates. *BMJ: British Medical Journal*, *306*(6876), 484-487.
- Zamberletti, E., Piscitelli, F., De Castro, V., Murru, E., Gabaglio, M., Colucci, P., . . . Parolaro, D. (2016). Lifelong imbalanced linoleic/alpha-linolenic acid intake impairs emotional and cognitive behavior in adult rats via changes in brain endocannabinoid system. *Journal of Lipid Research*, doi:jlrm068387
- Zhang, S., Morrison, J. L., Gill, A., Rattanatrak, L., MacLaughlin, S. M., Kleemann, D., . . . McMillen, I. C. (2013). Maternal dietary restriction during the periconceptional period in normal-weight or obese ewes results in adrenocortical hypertrophy, an up-regulation of the JAK/STAT and down-regulation of the IGF1R signaling pathways in the adrenal of the postnatal lamb. *Endocrinology*, *154*(12), 4650-4662. doi:10.1210/en.2013-1414