



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO FIN DE GRADO

EFFECTOS DE LA INGESTA MATERNA DE UNA DIETA DESEQUILIBRADA DURANTE LA LACTANCIA EN LA EXPRESIÓN DE GENES CLAVE IMPLICADOS EN LA ADIPOGENESIS EN LA PROGENIE. ANÁLISIS DEL POSIBLE PAPEL DE LOS MICROARNS.

Raúl Viadas Rupérez

Grado de Bioquímica

Facultad de Ciencias

Año académico 2019-20

EFFECTOS DE LA INGESTA MATERNA DE UNA DIETA DESEQUILIBRADA DURANTE LA LACTANCIA EN LA EXPRESIÓN DE GENES CLAVE IMPLICADOS EN LA ADIPOGENESIS EN LA PROGENIE. ANÁLISIS DEL POSIBLE PAPEL DE LOS MICROARNS.

Raúl Viadas Rupérez

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de las Islas Baleares

Año Académico 2019-20

Palabras clave del trabajo:

Adipogénesis, programación metabólica, obesidad, microARNs

Joana Sánchez Roig

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN/ABSTRACT.....	Página 1
1. INTRODUCCIÓN.....	Páginas 2-11
1.1. La obesidad como diana del interés científico en la actualidad.	2
1.2. Origen multifactorial de la obesidad.	3-4
1.3. Posible papel de los miARNs en la predisposición a la obesidad.	4
1.3.1. Papel de las modificaciones epigenéticas en la obesidad.	4-5
1.3.2. Biogénesis, funciones e importancia de los miARNs.	5-6
1.3.3. Relación entre los miARNs y el fenotipo obeso.	6-7
1.4. Tejido adiposo y adipogénesis.	7-11
2.4.1. Características intrínsecas del tejido adiposo.	7-8
2.4.2. Mecanismos de expansión del tejido adiposo.	8
2. OBJETIVO.....	Página 11
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	Páginas 11-14
3.1. Diseño experimental.	11-12
3.2. Cuantificación de ARN y expresión de los genes seleccionados.	13
3.3. Análisis estadístico.	13
3.4. Análisis in silico de posibles dianas de miARNs.	13-14
3.5. Búsqueda bibliográfica.	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	Páginas 14-24
4.1. Efectos de la dieta sobre la expresión de genes implicados en la adipogénesis.	14-19
4.1.1. Cambios en la expresión de <i>Pparg</i>	15-16
4.2.2. Cambios en la expresión de <i>Cebpa</i>	16
4.2.3. Cambios en la expresión de <i>Fasn</i>	17
4.2. Posible papel de miARNs de interés sobre genes implicados en la adipogénesis.	20-23
4.2.1. Regulación transcripcional de <i>Pparg</i> por miARNs en condiciones de obesidad.	20
4.2.2. Regulación transcripcional de <i>Cebpa</i> por miARNs en condiciones de obesidad.	20
4.2.3. Regulación transcripcional de <i>Fasn</i> por miARNs en condiciones de obesidad.	20-21
4.3. Búsqueda bibliográfica	23-24
5. CONCLUSIONES.....	Página 24
6. BIBLIOGRAFÍA.....	Página 24-27

RESUMEN

La obesidad es una patología cuya prevalencia ha aumentado de manera exponencial en las últimas décadas con una aparición cada vez más temprana. El interés por entender el mecanismo subyacente y su evolución lleva a establecer relaciones causales entre posibles factores de riesgo y el desarrollo de este fenotipo. Una de las propuestas que se encuentra actualmente en emergencia es la conocida como programación metabólica durante etapas tempranas del desarrollo, que, en función del estatus nutricional materno, puede provocar una mayor predisposición por parte de la progenie a desarrollar obesidad. Esta comunicación metabólica se debe, en parte, al efecto a nivel postranscripcional de los microARNs presentes en fluidos biológicos como la leche materna, cuyos niveles pueden verse modulados en función de la dieta. En base a esto, el presente trabajo de fin de grado tiene como objetivo en primer lugar determinar si la ingesta de una dieta desequilibrada por parte de madres durante la lactancia puede afectar a los niveles de expresión de genes que codifican para factores clave implicados en el proceso de la adipogénesis (*Pparg*, *Cebpga* y *Fasn*) en la descendencia. Posteriormente, se presentan posibles microARNs que participan directa o indirectamente en la regulación transcripcional de estos genes y que, por tanto, podrían tener algún papel en la regulación de la adipogénesis y el desarrollo de la obesidad.

Los resultados muestran algunas diferencias significativas en función de las distintas variables estudiadas, siendo estas la dieta materna durante la lactancia (control o cafetería), la dieta adulta (control diet o western diet) y el sexo. Se proponen además ejemplos concretos de microARNs, como la familia miR-27, cuyo estudio podría resultar interesante por su relación con una dieta desequilibrada, la adipogénesis y la obesidad.

ABSTRACT

Obesity is a disease whose prevalence has increased exponentially in recent decades with an increasingly early onset. Interest in understanding the underlying mechanism and its evolution leads to establishing causal relationships between possible risk factors and the development of this phenotype. One of the proposals that is currently in emergency is known as metabolic programming during early stages of development, which, depending on maternal nutritional status, can cause a greater predisposition on its progeny to develop obesity. This metabolic communication is, in part, due to the effect at post-transcriptional level of the microRNAs present in biological fluids such as breast milk, whose levels can also be modulated according to diet. Taking this into account,, the present bachelors's thesis aims, in first place, to determine whether the intake of an unbalanced diet by mothers during lactation can affect the expression levels of genes that code for key factors involved in the process of adipogenesis (*Pparg*, *Cebpga* and *Fasn*) in offspring. Subsequently, possible microRNAs that participate directly or indirectly in the transcriptional regulation of these genes and could have some role in the regulation of adipogenesis and the development of obesity are presented.

Results show some significant differences depending on the different variables that were studied, being these the maternal diet during lactation (control or cafeteria), the adult diet (control diet or western diet) and sex. Specific examples of microRNAs are also proposed, such as the miR-27 family, the study of which could be interesting due to its relationship with an unbalanced diet, adipogenesis and obesity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La obesidad como diana del interés científico en la actualidad.

La incidencia del sobrepeso en la población ha aumentado de manera significativa en las últimas décadas.^{1,2} Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2016 aproximadamente 1900 millones de personas padecían sobrepeso, de las cuales 650 millones eran obesas. Estas cifras representan alrededor del 13% de la población adulta a nivel mundial, habiéndose triplicado la prevalencia en las últimas 5 décadas.³ Los cambios en el estilo de vida han hecho que lo que en épocas pasadas podía considerarse un signo de riqueza, en la actualidad se vincule con la creciente aparición de complicaciones a nivel metabólico, cuyo índice de mortalidad empeora con los años.^{4,5} Esto hace que actualmente el sobrepeso sea considerado como un importante desafío tanto para la ciencia como para la salud pública.¹

La obesidad se define como una condición cuya etiología es multifactorial, en la cual el exceso energético y lipídico presentes en un organismo se acumulan en forma de tejido adiposo o grasa. Como diagnóstico de la obesidad se utiliza principalmente, pero no de manera exclusiva, el índice de masa corporal (IMC). Bajo este criterio, se considera obesa a una persona cuyo IMC sea igual o superior a 30 kg/m², aunque el fenotipo de sobrepeso se considera a partir de 25 kg/m².³

El aumento excesivo del tejido adiposo provoca la aparición de efectos adversos sobre la salud, reduciendo la esperanza de vida y actuando como factor de riesgo de otras patologías, muchas de las cuales se engloban bajo el conocido como síndrome metabólico.² Entre las piezas que componen este puzzle, aún por resolver, encontramos alteraciones y patologías cuyo impacto en la población suscitan un enorme y creciente interés dentro de la comunidad científica. Ejemplos de esto son la resistencia a la insulina, la diabetes mellitus tipo 2, la enfermedad cardiovascular, la aterosclerosis, determinados tipos de cáncer, etc.^{1,5} En conjunto, el síndrome metabólico se considera la principal causa de mortalidad en el mundo.⁴

A raíz de esto, la obesidad se encuentra cada vez más presente en el ámbito científico con el objetivo de conocer los mecanismos involucrados en el desarrollo de este fenotipo, así como de las complicaciones asociadas (*Figura 1*). Entender las bases moleculares responsables de la obesidad se considera esencial a fin de identificar biomarcadores para su diagnóstico, así como dianas terapéuticas para el diseño de fármacos antiobesidad u otras estrategias preventivas.¹



Figura 1: Incremento cuantitativo de la investigación relacionada con la obesidad. Se representa a través de un gráfico de barras el número de publicaciones existentes por año para la búsqueda 'obesity' en la base de datos PubMed desde 1970 hasta la actualidad, como reflejo del su creciente interés y estudio.

1.2. Origen multifactorial de la obesidad.

La obesidad es una patología de origen multifactorial en la cual influyen principalmente factores genéticos, ambientales y socioeconómicos. El aumento de la prevalencia a la obesidad ha tenido un mayor impacto en los países desarrollados, debido principalmente a los factores ambientales y socioeconómicos. Estos englobarían aspectos del estilo de vida de cada individuo, como la actividad física, la cantidad de ingesta y, de especial interés, la calidad o composición de la misma. Sin embargo, son los estudios centrados en la asociación entre factores genéticos y la mayor o menor susceptibilidad a presentar obesidad los que se encuentra actualmente en emergencia.^{1,4}

Los genes con una mayor influencia a la hora de determinar el potencial desarrollo del fenotipo obeso son aquellos implicados en el control del apetito, en el metabolismo de lípidos o glúcidos y en la diferenciación de los adipocitos. Determinados polimorfismos en estos genes pueden tener un efecto favoreciendo la predisposición o susceptibilidad a padecer obesidad.^{2,4}

A esto hay que sumarle que recientemente se ha establecido una relación entre eventos que ocurren en etapas tempranas del desarrollo, como el embarazo o la lactancia, sobre la carga genética y el riesgo a desarrollar obesidad en la edad adulta.²

Para las madres gestantes, el embarazo como tal puede suponer un factor de riesgo que desencadene la aparición de alteraciones o patologías durante este periodo. Un claro y extendido ejemplo de esto es la diabetes gestacional.⁶ Pero, lo que también muestran las más recientes investigaciones es la capacidad de determinados hábitos o características de la madre para repercutir sobre la salud de la descendencia a corto y/o largo plazo.⁷ En este sentido, la dieta y la obesidad materna *per se* pueden tener un papel importante en lo que se conoce como programación metabólica de la descendencia a patologías como la obesidad, además de otras complicaciones asociadas como la hipertensión, la enfermedad cardiovascular (ECV) o la resistencia a la insulina. Se haría así referencia a un impacto *in utero*, que también se produce durante las etapas más tempranas del desarrollo como la lactancia, sobre la progenie y que muchas veces se manifiesta a través del fenotipo de manera permanente después del parto.^{7,8}

Los principales elementos implicados en esta programación de la descendencia a la aparición de la obesidad en función del estado nutricional de la madre serían alteraciones epigenéticas, la transmisión de un perfil descompensado de nutrientes fruto de una dieta desequilibrada, la elevación en los niveles de citoquinas inflamatorias o la desregulación de adipoquinas como la leptina o la adiponectina (*Figura 2*).⁹

La potencial aparición de este conjunto de factores se considera responsable de los efectos que pueden producirse sobre la descendencia ya en las primeras etapas de vida, o en la edad adulta después de pasar por un periodo de latencia. En este último caso, una situación de desafío, como pueden ser malos hábitos alimenticios por parte de la descendencia, podría desencadenar estos efectos, los cuales existirían predefinidos.¹⁰

Esta predisposición a la obesidad, ya descrita por Barker *et al.* bajo el nombre de '*The barker's hypothesis*' en 1990, evidenciaría el ya comentado carácter multifactorial de la obesidad, implicando factores ambientales como el estatus nutricional materno sobre el patrón genético preexistente, con un papel relevante sobre todo en etapas tempranas del desarrollo. Además, se empieza a hablar de un efecto vertical transgeneracional, el cual tendría consecuencias negativas al estar perpetuando la obesidad en futuras generaciones y no solo en la primera generación.⁸

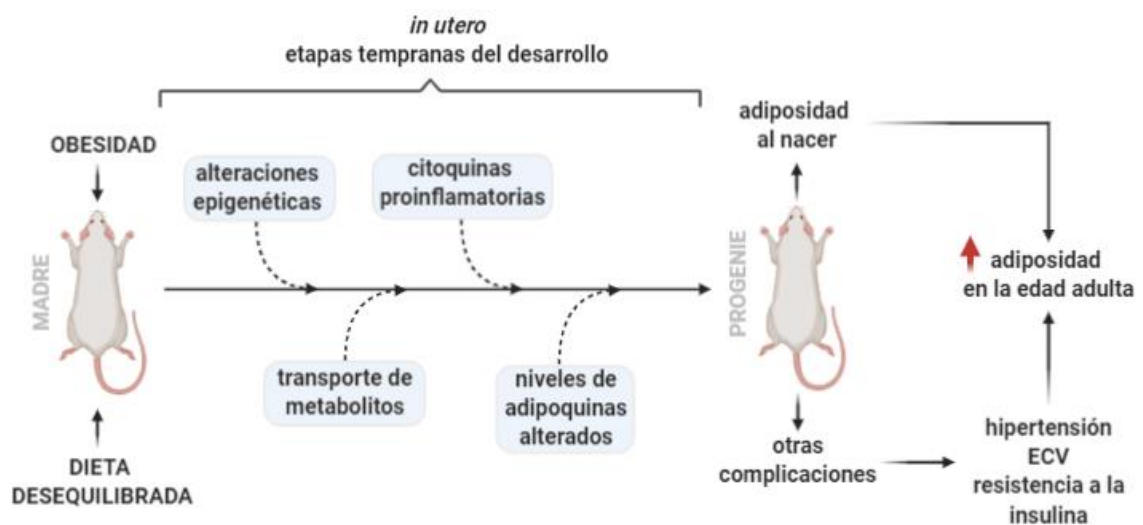


Figura 2. Representación gráfica de los principales elementos implicados en la comunicación metabólica existente entre la madre y su descendencia para la predisposición a la obesidad, utilizando como modelo la rata. Elaboración propia utilizando BioRender.

Los mecanismos exactos a través de los cuales la exposición a un entorno nutricional se traduce en patologías sobre la descendencia no están del todo descritos, siendo las modificaciones epigenéticas la principal propuesta responsable.^{7,11}

1.3. Posible papel de los miARNs en la predisposición a la obesidad.

1.3.1. Papel de las modificaciones epigenéticas en la obesidad

El concepto de epigenética se introdujo en la década de 1940 de la mano de Conrad Hal Waddington (1905-1975) y hace referencia a las modificaciones que controlan la expresión génica de manera heredable sin producir cambios estructurales en la secuencia de ADN.²

Actualmente, prometedoras investigaciones trazan un vínculo entre la epigenética y la aparición de varias patologías, entre las cuales se encuentra la obesidad. Existen diferentes mecanismos epigenéticos como la activación o inactivación de genes a través de metilación de ADN, la acetilación de histonas, la remodelación de la cromatina o el papel de los microARNs (miARNs) a nivel de la regulación postranscripcional.⁷

La dieta representa una fuente donadora de grupos metilo, grupos acilo o miARNs, y en base a esto, una alimentación desequilibrada puede llevar a la aparición de perfiles alterados en cualquiera de estos cofactores epigenéticos.¹² Estas variaciones, pueden ser detectadas al estudiar su presencia en varios fluidos biológicos como son la orina, el plasma, el suero o la leche materna, en los cuales su presencia suele ser representativa.¹³

La programación epigenética se produce en etapas muy tempranas del desarrollo, por lo que será entonces cuando el ADN sea más propenso a sufrir las posibles modificaciones llevadas a cabo por agentes externos como la dieta. Un ejemplo de esto sería el periodo de lactancia.^{7,8}

La leche materna es una rica fuente de nutrientes y factores bioactivos para los recién nacidos. Sus propiedades hacen que su consumo sea recomendado para asegurar el correcto desarrollo de procesos como son el crecimiento, la nutrición primaria o la protección inmunológica en etapas tempranas del desarrollo. La composición de la leche materna puede verse modulada en función de la dieta materna y, de todos los componentes que pueden verse afectados, se destacan los ya mencionados miARNs.¹⁴⁻¹⁶

Se ha propuesto que los miARNs presentes en la leche materna podrían regular la expresión génica de la descendencia durante el periodo de lactancia, estableciendo de esta forma una especie de comunicación metabólica con la progenitora. Esto a su vez sugiere, y se ha demostrado, que la transmisión de un perfil alterado de miARNs a la descendencia a través de la leche materna podría desencadenar en ésta consecuencias patológicas. De esta forma, se verían reflejadas las implicaciones epigenéticas provenientes del estatus nutricional de la madre sobre el fenotipo de la descendencia.^{12,14,17}

La lactancia representa por tanto una vía de transmisión de miARNs desde la madre a su progeñe, que una vez absorbidos, viajarán a los tejidos diana donde llevarán a cabo su función en la regulación postranscripcional. Los miARNs se encuentran protegidos de la degradación catalizada por RNAsas debido a que son transportados en vesículas como exosomas, en lipoproteínas como las de alta densidad (HDL) o viajan en forma libre unidos a proteínas como AGO2.^{13,18,19}

1.3.2. Biogénesis, funciones e importancia de los miARNs

Los miARNs, descubiertos en 1993 por Lee y colaboradores, son ARNs pequeños monocatenarios y no codificantes de entre 21-25 nucleótidos cuya función es la regulación postranscripcional de la expresión génica.²⁰

La biogénesis de miARNs tiene lugar en el núcleo celular (*Figura 3*). Pueden derivar de genes específicos para miARNs, de los intrones de genes codificantes para proteínas o incluso de transcritos policistrónicos. El punto de partida será el resultado de la transcripción de cualquiera de estas secuencias. Esto da lugar a precursores de unos 100 nucleótidos conocidos como pri-miARN. El procesamiento de los extremos 3' y 5' del pri-miARN es realizado por la endoribonucleasa DROSHA junto con la proteína DGCR8. Esto dará lugar a un intermediario de entre 60-70 nucleótidos, el pre-miARN, que será capaz de abandonar el núcleo a través de los transportadores EXPORTINA-5 y Ran-GTP, ambos situados en la membrana nuclear. Será entonces cuando otra endoribonucleasa citoplasmática conocida como DICER actuará sobre el pre-miARN dando lugar a moléculas de aproximadamente 22 nucleótidos. La secuencia bicatenaria resultante es incorporada al complejo de silenciamiento RISC, que junto a la proteína AGO, harán que una de las 2 cadenas sea degradada y que la otra dé lugar a la molécula de miARN madura. Esta será capaz de unirse a su ARNm diana unida al complejo RISC.^{13,21}

Los miARNs están presentes en todos los organismos multicelulares. Sus funciones reguladoras se han conservados a lo largo de la evolución con protagonismo en procesos tan importantes como son la diferenciación o proliferación celular, el metabolismo o la acción del sistema inmune. Actúan regulando negativamente la expresión génica mediante la unión a regiones complementarias del ARN mensajero (ARNm) de los genes diana.²²

Esta complementariedad es fundamental sobre todo en aproximadamente 8 nucleótidos que reciben el nombre de seed region o región semilla.^{4,13} La regulación que llevan a cabo puede producirse además de 2 maneras diferentes: inhibiendo la traducción al impedir que los ribosomas lleven a cabo su función sobre el ARNm o favoreciendo la degradación del transcrito al cual se encuentra unido el miARN.⁴

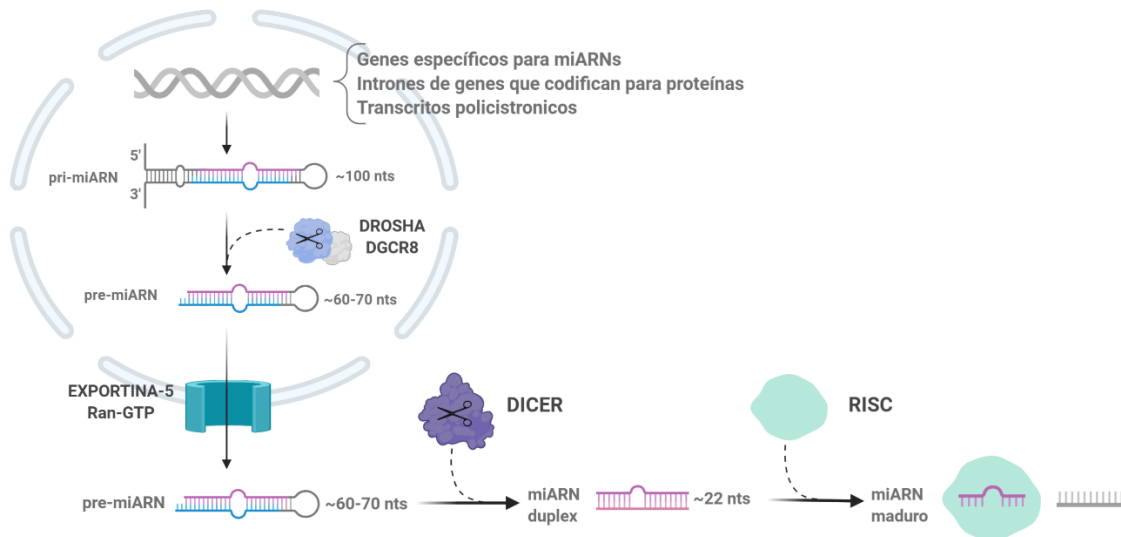


Figura 3: Biogénesis nuclear y procesamiento de los miARNs. Elaboración propia utilizando BioRender.

1.3.3. Relación entre los miARNs y el fenotipo obeso

La importancia biológica de los miARNs se pone de manifiesto al comprobar el elevado número de genes para los cuales son dianas, algo que puede determinarse mediante un análisis *in silico*. Como se ha comentado anteriormente, la secuencia que determina la complementariedad entre un miARN y su ARNm diana es una secuencia corta, lo que eleva las posibilidades de interacción con múltiples dianas. Esto hace que estén involucrados en la mayoría de los procesos biológicos, ejerciendo un papel esencial en la diferenciación de adipocitos, la integración metabólica, el metabolismo lipídico, la resistencia a la insulina y la regulación del apetito, entre otros. Es por ello por lo que la desregulación de su presencia y funcionalidad en el tejido adiposo puede contribuir al desarrollo de la obesidad y del resto de patologías asociadas.^{4,13}

El mecanismo a través del cual los miARNs son capaces de modular la adipogénesis y el resto de los procesos en los cuales están involucrados tienen que ver con el control de la expresión génica. Regulan negativamente y de manera coordinada la expresión tanto de genes directamente implicados en estos procesos, como de los transcritos que codifican para factores de transcripción encargados a su vez de regular estos genes, englobando así un amplio abanico de dianas.²⁰

La modulación de la dieta materna, así como un elevado peso corporal (por tanto, la obesidad per se) pueden tener un efecto alterando el perfil fisiológico de miARNs, el cual será transmitido a la prole, entre otras vías, gracias a la lactancia, con importantes efectos en la adipogénesis.²⁰

En los últimos años, se han identificado más de 30 miARNs o familias de miARNs relacionadas con la diferenciación de los adipocitos en humanos. Sin embargo, en estudios con modelos animales, principalmente roedores, se ha evidenciado la actuación de otros muchos que aún está por determinar si están relacionados con la adipogénesis de humanos y a qué niveles.²¹

La determinación del perfil alterado de miARNs, así como los niveles de referencia, pueden utilizarse como biomarcador de la obesidad, teniendo en cuenta que un buen biomarcador será aquel cuyos niveles se ven alterados significativamente ante condiciones adversas como las patológicas y que además tiene una fácil accesibilidad, preferiblemente mediante técnicas no invasivas.²⁰

1.4. Tejido adiposo y adipogénesis

1.4.1. Características intrínsecas del tejido adiposo.

El tejido adiposo ha sido comúnmente considerado como un tejido pasivo, cuya única función era el almacenamiento energético en forma de triglicéridos. Esto ha llevado a que suscitara menos interés de cara a su investigación y comprensión, recibiendo menos atención que otros tejidos u órganos metabólicamente más activos (*Figura 4A*). Sin embargo, las evidencias actuales muestran un dinamismo intrínseco al propio tejido adiposo, conseguido principalmente gracias a su papel endocrino a través de las adipoquinas y al resto de su secretoma. Los factores bioactivos secretados por el tejido adiposo transmiten información a otros órganos como el páncreas, el cerebro o el hígado, afectando al metabolismo de todo el organismo. Entre estas adipoquinas encontramos la leptina, la adiponectina o la visfatina.²

Otras de las funciones que han hecho que se abandone la concepción del tejido adiposo como un tejido pasivo son la termogénesis, la amortiguación de órganos o evitar la lipotoxicidad gracias al almacenamiento de lípidos.^{1,23} Actualmente se tiene en consideración también al tejido adiposo por su papel en la reconstrucción de otros tejidos dañados.²⁴

Existen dos tipos principales de tejido adiposo: el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo marrón, los cuales presentan diferencias en cuanto a su composición, localización y funciones. El tejido adiposo marrón está principalmente compuesto por adipocitos marrones cuya función representativa es la termogénesis catalizada por la proteína mitocondrial UCP-1, la cual además sirve como marcador celular.⁴ Por otro lado, está el tejido adiposo blanco, cuyo componente mayoritario son los conocidos como adipocitos blancos. Estos adipocitos tienen una morfología generalmente esférica y prácticamente todo su volumen está ocupado por el almacenamiento de lípidos. Su función es la de proporcionar combustibles metabólicos a largo plazo. Cabe destacar el reciente descubrimiento del tejido adiposo beige, cuyo aspecto y marcadores proteicos como la UCP-1 o el PGC-1 α hacen que se asemejen funcionalmente a los adipocitos marrones pero su localización es propia de los depósitos de tejido adiposo blanco (*Figura 4B*).^{2,4}

El emergente interés por el tejido adiposo por parte de la comunidad científica ha funcionado como motor para el descubrimiento de los elementos o factores implicados en su metabolismo, lo cual puede llevar a descifrar los mecanismos asociados a la obesidad y al resto de patologías que componen el síndrome metabólico. El tejido adiposo y la obesidad, por tanto, evolucionan de manera paralela, con un efecto sinérgico de los descubrimientos entre ambos. (*Figura 4C*)

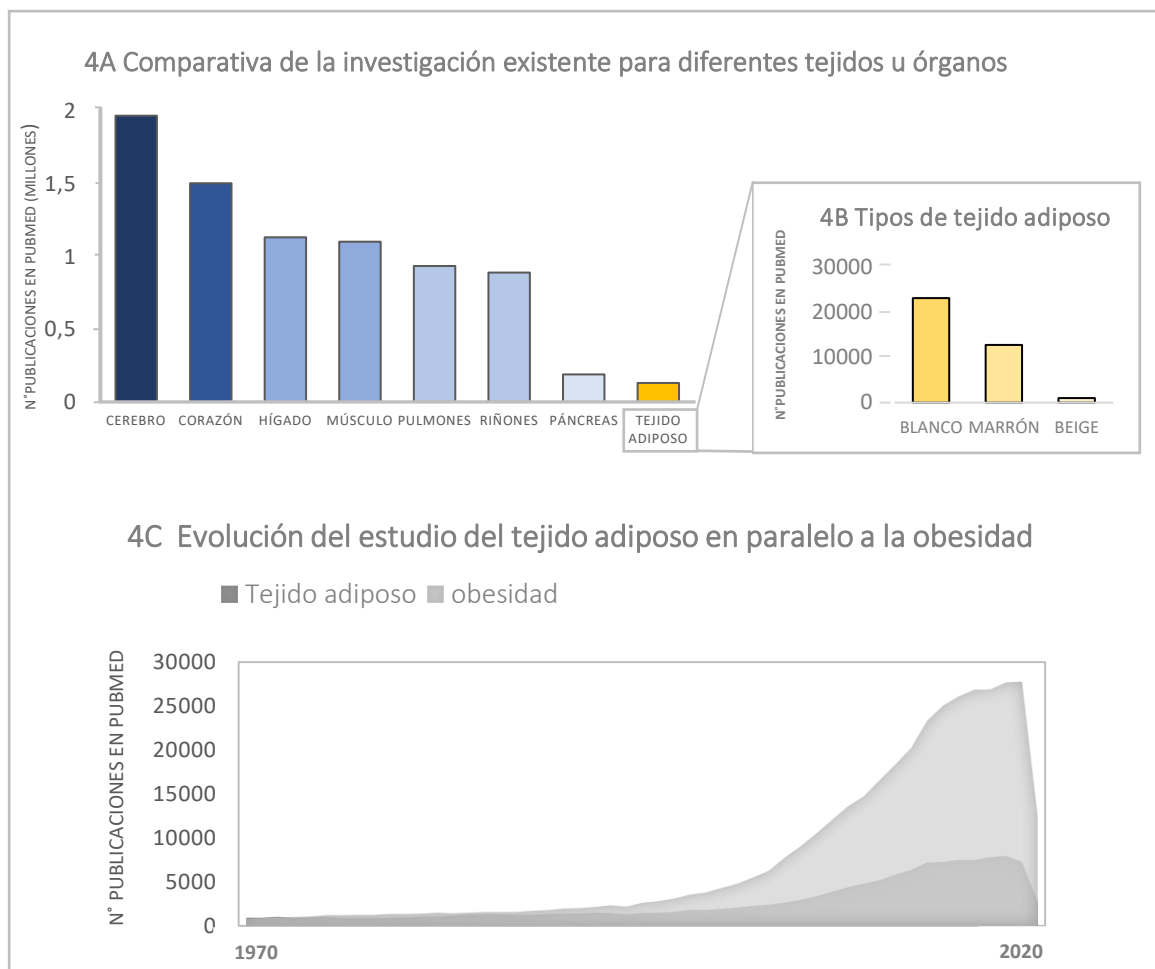


Figura 4: Representación gráfica de la creciente atención recibida por el tejido adiposo. **4A.** Gráfico de barras indicativo del número de publicaciones existentes en la actualidad para diferentes tejidos u órganos en comparación con el tejido adiposo (Búsquedas en Pubmed: 'Brain', 'Heart', 'Liver', 'Muscle', 'Lungs', 'Kidneys', 'Pancreas' y 'Adipose'). **4B.** Gráfico de barras comparativo del número de publicaciones existentes para los diferentes tipos de tejido adiposo (Búsquedas en Pubmed: 'White adipose', 'Brown adipose', 'Beige adipose'.) **4C.** Evolución del estudio del tejido adiposo en paralelo a la obesidad (Búsquedas en Pubmed: 'adipose' y 'obesity').

1.4.2. Mecanismos de expansión del tejido adiposo.

Cuando la ingesta de calorías en un individuo es superior al gasto energético se promueve la expansión del tejido adiposo a través de 2 mecanismos: la hipertrofia y la hiperplasia.

El mecanismo de hipertrofia corresponde al aumento de tamaño de los adipocitos a causa de un mayor almacenamiento de triglicéridos en su interior. Estos adipocitos tendrán asociadas graves disfunciones que afectan a su metabolismo. En primer lugar, los adipocitos hipertróficos secretan una gran cantidad de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF α). Esto provocará la aparición de un ambiente proinflamatorio a nivel del tejido adiposo que tendrá la capacidad de inhibir algunos de los factores de transcripción necesarios para la maduración de los preadipocitos (PPAR γ y C-EBP α).^{1,25}

Se verá aumentada la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, lo cual también tiene una contribución proinflamatoria. Esto llevará a la aparición del fenómeno de hipoxia en el tejido adiposo debido a una insuficiente irrigación o angiogénesis, lo cual puede ser responsable de la muerte de los adipocitos. Este estrés a nivel celular desencadenará la aparición de necrosis y la liberación de ácidos grasos simples a la circulación, lo que contribuye a la deposición de grasa sobre tejidos u órganos como el hígado, provocando la aparición de esteatosis hepática.^{1,19}

Por otro lado, el mecanismo de hiperplasia se caracteriza por el aumento del número de adipocitos en el tejido adiposo mediante el proceso de adipogénesis. Es decir, el paso de preadipocitos a adipocitos maduros. Existen evidencias que demuestran que adipocitos en mayor número, pero menor tamaño, se asocian a una menor susceptibilidad para el desarrollo de patologías como la diabetes, lo cual se ve potenciado por el aumento del tamaño o hipertrofia.²⁶

La adipogénesis es la formación y diferenciación de adipocitos maduros a partir de sus precursores gracias a un sofisticado y orquestado programa de expresión génica.²⁴ Como ya se vio en 1979 en los estudios de *Green & Kehinde*, cuando los preadipocitos se inyectan de manera subcutánea en ratones, responden a señales fisiológicas del organismo para pasar a diferenciarse a adipocitos.¹ En función de las señales que se reciban, se producirá la diferenciación de adipocitos u otros tipos celulares de origen común, así como tejido adiposo marrón o beige.²³

Existen diversos factores que se encuentran regulando el proceso de adipogénesis en mamíferos. Entre ellos destacamos hormonas endocrinas (hormonas de crecimiento, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), la insulina, hormonas esteroideas, etc.), citoquinas (como el interferón γ (INF- γ) o TNF- α , que inhiben este proceso y potencian la hipertrofia), moléculas de señalización (proteína quinasa C (PKC), adenosín monofosfato cíclico (cAMP), GTPasas de la familia Rho, etc.) miARNs y/o factores de transcripción.^{1,8}

De entre la gran variedad de factores de transcripción implicados en el proceso, algunos de los más representativos son el *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) y el *CCAAT/enhancer-binding protein α* (C-EBP α).^{1,8}

El PPAR γ se trata de un factor de transcripción dependiente de ligando perteneciente a la familia de los receptores nucleares (RNs). Lleva a cabo la función de modulación de la expresión génica a través de su interacción a elementos de respuesta presentes en la secuencia de ADN (PPREs), normalmente en forma de heterodímero junto con el receptor X retinoide α (RXR α).¹

El PPAR γ es considerado el principal modulador de la adipogénesis. Este hecho puede demostrarse a través de la expresión ectópica in vitro de PPAR γ en precursores típicamente no adipogénicos, lo cual aportaría la capacidad de diferenciarse a adipocitos. Muchos de factores de transcripción encargados de potenciar el proceso de adipogénesis se encargan de favorecer la expresión de PPAR γ , como es el caso de C/EBP β o C/EBP δ , algunos miembros de la familia de STATs (*signal transducer and activator of transcription*) o de la familia KLF (*Krüppel-like family*). Por otro lado, muchos de los represores transcripcionales de la adipogénesis también tienen un efecto directo sobre el PPAR γ . Ejemplo de ello son los factores GATA2 o CHOP.¹

A parte de sus funciones en la adipogénesis, el PPAR γ también contribuye a la homeostasia de la glucosa y la sensibilidad a la insulina. Su papel se puede demostrar a través de modelos animales *knockouts* para el gen codificante, cuyo efecto tendría consecuencias como la resistencia a la insulina o la aparición de lipodistrofia, que es la ausencia de tejido adiposo.¹

La familia de factores de transcripción C-EBP se caracteriza en conjunto por un dominio de cremallera de leucina o bZIP con el que se unen a la secuencia de ADN que se encuentran regulando. Los estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han identificado los C/EBPs α , β y δ como importantes reguladores de la adipogénesis, lo cual se evidencia por el aumento de tamaño de los adipocitos (hipertrofia) de ratones *knockout* para dichos genes.

Intervienen además en otras funciones como la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), la autofagia o inhibiendo vías de señalización como Wnt/ β -catenina, lo cual favorece la adipogénesis.

De acuerdo con el modelo más aceptado en la actualidad, el proceso de adipogénesis se basaría en 2 fases que separan 3 estadios celulares: los precursores mesenquimáticos, los preadipocitos y los adipocitos maduros (*Figura 5*).¹ Como se ha mencionado, se trata de un proceso de diferenciación celular basado en cambios en el perfil de expresión génica. El primer evento que ocurre para permitir la adipogénesis es la adquisición del compromiso que restringe la multipotencialidad del precursor mesenquimático debido a los inputs externos existentes. Se elimina así la posibilidad de dar lugar a otros tipos celulares de origen común como son los mioblastos, condroblastos u osteoblastos. Será entonces cuando se detenga el ciclo celular y por tanto el crecimiento y se alcance, de forma paralela al almacenamiento de triglicéridos, el estadio de preadipocito. Los cambios producidos sobre la expresión y regulación de diferentes genes y la permanente infiltración de triglicéridos harán que se alcance la madurez de los adipocitos.¹

La detección de los factores precursores y las vías de señalización necesarias para alcanzar cada fase han sido posibles gracias a modelos *in vitro* de cada tipo celular, aunque con diferentes resultados *in vivo*, confirmando la complejidad del proceso real.¹

La adipogénesis se ve inducida en primer lugar por la expresión de C-EBP β y C-EBP γ , que actuarán a nivel transcripcional sobre los promotores de los genes que codifican para PPAR γ y C-EBP α . A su vez estos dos factores funcionan de forma sinérgica siendo considerados, sobre todo PPAR γ , como los reguladores principales de la adipogénesis.²⁷

Ambos factores actúan favoreciendo la expresión de genes que codifican para enzimas, factores u otros elementos como hormonas, necesarios en el metabolismo del tejido adiposo. Como ejemplos de ello están factores de transcripción de la familia SREBP (*Sterol regulatory element-binding Protein*), transportadores como GLUT4 o FABP, u hormonas como la adiponectina. De entre estos factores involucrados destaca también la ácido graso sintasa (FAS), que es el enzima encargado de la síntesis de ácidos grasos *de novo*.^{1,23,28}

Además de los mencionados, existe un amplio grupo de factores de transcripción y vías de señalización implicadas en la regulación de este proceso, bien sea potenciando la expresión de determinados genes o inhibiéndola.¹

Una alteración en el proceso de adipogénesis llevaría a la aparición de lipodistrofias o el desarrollo de patologías asociadas a la hipertrofia del tejido adiposo.¹ Por otro lado, un aumento de la adipogénesis de manera no regulada produce inflamación de bajo grado y la desregulación de la secreción de adipoquinas (adiponectina, leptina, resistina...) lo que promueve la acumulación de triglicéridos en el hígado y tejido adiposo, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, contribuyendo al ya mencionado síndrome metabólico.¹³

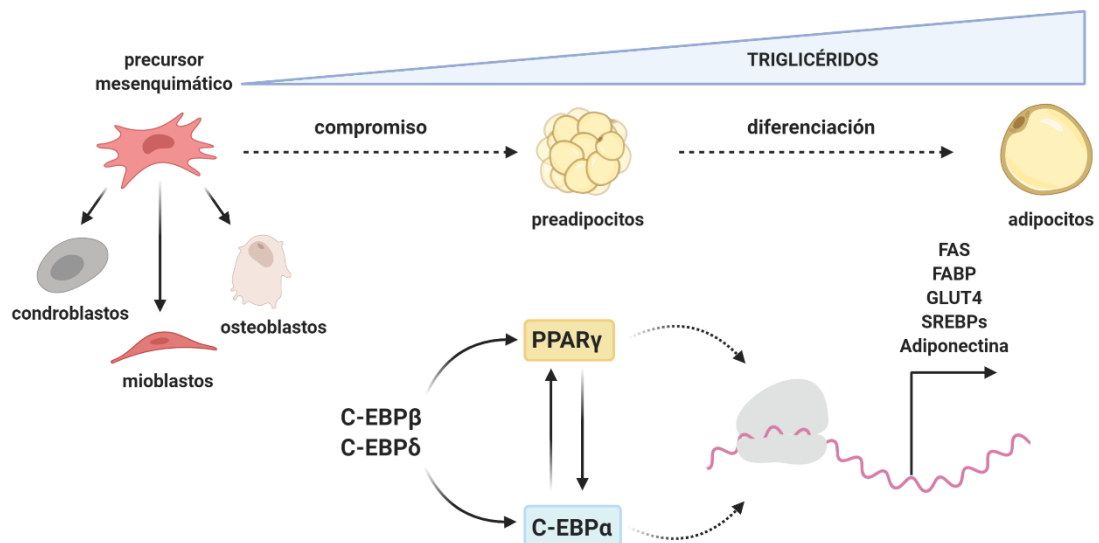


Figura 5: Diferenciación de adipocitos a partir de precursores mesenquimáticos. Mecanismo y genes implicados debido a un programa orquestado de expresión génica, de forma paralela a la acumulación de triglicéridos. Elaboración propia utilizando BioRender.

2. OBJETIVO

Como se ha comentado, la ingesta materna de una dieta desequilibrada durante periodos clave del desarrollo, como puede ser la lactancia, pueden tener efectos adversos en la descendencia, ya que se asocia a una mayor predisposición al desarrollo de obesidad en la edad adulta.

El objetivo de este trabajo de fin de grado es determinar si la ingesta de una dieta desequilibrada por parte de madres durante la lactancia puede afectar a los niveles de expresión de genes clave para el proceso de la adipogénesis en su descendencia.

Para ello, en primer lugar, se ha analizado los niveles de expresión de los genes que codifican para PPAR γ , C-EBP α y FAS en el tejido adiposo de crías en la edad adulta de madres alimentadas con dieta de cafetería durante la lactancia. Se ha analizado el efecto de la dieta materna durante la lactancia, así como el efecto de la ingesta en estas crías de una dieta obesogénica en la edad adulta y del sexo. Posteriormente, mediante un análisis *in silico*, se han estudiado posibles miARNs que tengan como diana algunos de estos genes implicados o relacionados con la adipogénesis y que, por tanto, podrían tener algún papel en la regulación de este proceso.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental.

Para realizar el análisis de los niveles de expresión de los genes que codifican para PPAR γ , C-EBP α y FAS se han utilizado muestras de tejido adiposo retroperitoneal procedente de un total de 62 ratas, hembras y machos de la especie *Rattus norvegicus*, las cuales habían sido previamente sometidas a 2 intervenciones sobre su dieta; una primera sobre la madre durante el periodo de

lactancia (Dieta control-CD o Dieta de cafetería-CAF) y otra a los 4 meses de vida, que suponía una situación desafío (Dieta control-CD o Western Diet-WD), antes de ser sacrificadas a los 6 meses. Aunque el autor de este trabajo de fin de grado no estuvo directamente implicado en la obtención de las muestras experimentales, se incluye aquí una descripción del diseño experimental a fin de describir las muestras utilizadas en el marco de este diseño experimental.

Se alimentó con una dieta de cafetería madres lactantes desde el día 1 hasta el final del periodo de lactancia. Paralelamente se siguió un grupo de ratas alimentadas con dieta control. Las crías de las madres control y de las madres alimentadas con dieta de cafetería, fueron destetadas a día 21 de edad, y estabuladas de 2 en 2, machos y hembras por separado, hasta los 4 meses de edad. Durante este tiempo, tanto las crías de madres control como las crías de madres alimentadas con una dieta de cafetería fueron alimentadas con una dieta control. A los 4 meses de edad, la mitad de las crías continuó con una dieta control, mientras que la otra mitad fue alimentada con una dieta comercial (western diet) hasta su sacrificio, a los 6 meses de edad.

Por tanto, en este Trabajo de fin de grado se han utilizado los 8 grupos experimentales recogidos en la *Figura 6*, todos ellos con una n =7 - 8 individuos.

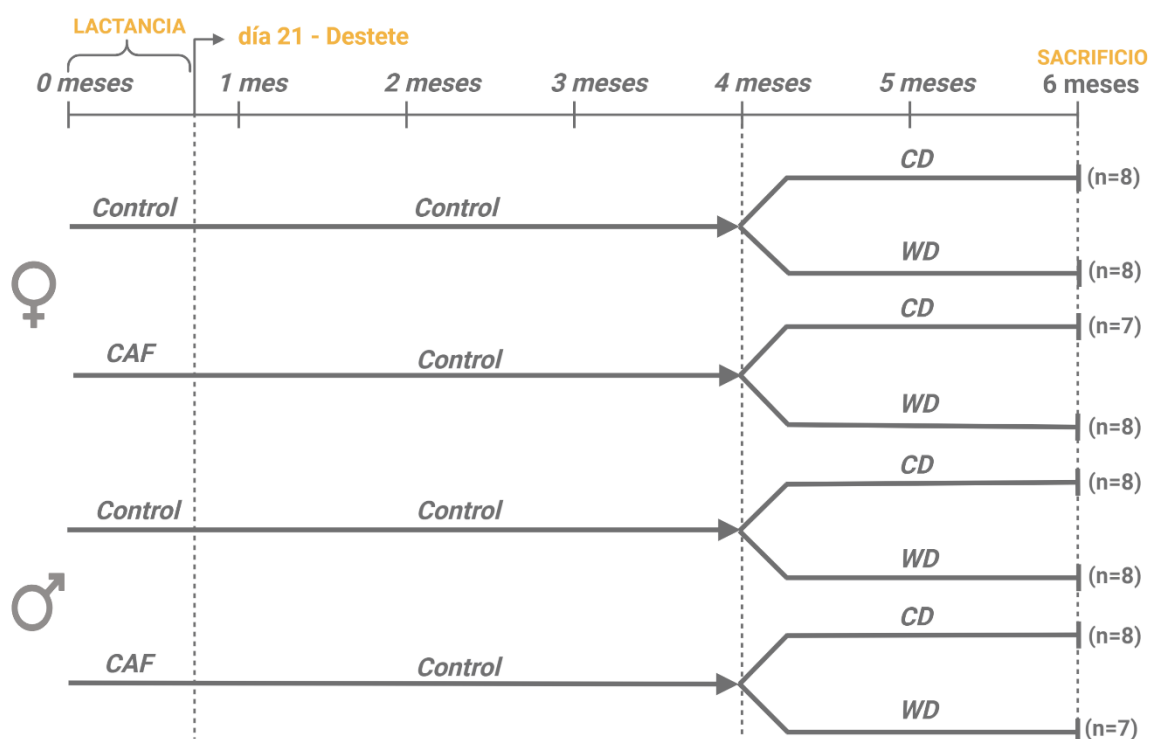


Figura 6: Esquema del diseño experimental seguido para obtener los 8 grupos de trabajo. Elaboración propia utilizando BioRender.

A partir de las muestras de tejido adiposo se realizó la extracción de ARNs pequeños por el método de Tripure siguiendo las especificaciones del fabricante. Las muestras disueltas en agua libre de ARNasas fueron conservadas a -80°C hasta el momento de su uso.

3.2. Cuantificación de ARN y expresión de los genes seleccionados.

Se empleó la técnica espectrofotométrica de NanoDrop para llevar a cabo un análisis cuantitativo del ARN presente en cada una de las muestras, así como una evaluación de la integridad de las mismas. Posteriormente se siguió un protocolo de retrotranscripción (RT) y una PCR a tiempo real (RT-qPCR) para 3 genes previamente seleccionados con un papel destacado en la adipogénesis según la bibliografía consultada (*Pparg*, *Cebpa* y *Fasn*). También se utilizó el gen *Gdi* como gen de referencia por su expresión constitutiva. Siguiendo las instrucciones del protocolo, para cada muestra, el punto de partida fueron 0.25 µg de ARN de tejido adiposo retroperitoneal. Este ARN fue convertido a ADNc mediante retrotranscripción usando por muestra 7.5 µL de RT-mix (Buffer, dNTPs, H₂O, hexámeros, inhibidores y la enzima retrotranscriptasa). La reacción de RT se produjo bajo las siguientes condiciones: 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 50 minutos, 70 °C durante 15 minutos y una fase final a 4 °C.

Tras esto, se siguió un protocolo de PCR a tiempo real cuyo primer paso fue hacer una dilución 1/10 del producto RT usando agua libre de ARNasas. Tras esto, se mezclaron 2 µL de la dilución junto con 9 µL de SyBrGreen-mix (Power SyBr Green, H₂O y primers forward y reverse específicos del gen en cuestión) para realizar la reacción de amplificación a tiempo real a partir del ADNc. Las condiciones de la PCR fueron un inicio a 95 °C durante 10 minutos que consiguió la activación del enzima, ya que el enzima que se incluye en el Power Sybr Green es de tipo hotstart, seguido de 40 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95 °C (desnaturalización) y 1 minutos a 60 °C (annealing). Se finalizó con un proceso de desnaturalización para comprobar el número de picos obtenidos en la amplificación que consistió: 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C y 15 s a 95 °C.

Se utilizó *StepOne Plus Software* para obtener los valores de Crossing point (CT) que serían usados para conocer la expresión relativa de cada gen estudiado. Calculamos el valor relativo de expresión respecto al valor del grupo de hembras Control-CD, considerado como 100%.

3.3. Análisis estadístico

Los datos se presentan como valores medios de expresión del gen \pm el error estándar de la media (SEM). Para realizar el análisis estadístico, se utilizó el paquete estadístico *SPSS Statistics*. Como criterio de significancia se usó un p-valor $< 0,05$.

El test ANOVA de 2 factores se empleó para medir de manera separada en función del sexo los efectos de los diferentes factores estudiados: lactancia (control o cafetería), dieta en la edad adulta (CD o WD) o el efecto interactivo de ambas. La variable dependiente en cada caso fue la expresión de cada uno de los genes estudiados. Las comparaciones por pares entre las variables lactancia, dieta adulta y sexo se llevaron a cabo mediante el test *U de Mann-Whitney*, ya que en todos los casos se dispuso de grupos con $n < 10$.

3.4. Análisis in silico de posibles dianas de miARNs.

Se realizó una predicción *in silico* de los miARNs que tengan como diana los ARNm del *Pparg*, *Cebpa* y *Fasn*. Para ello, se recurrió a la base de datos miRDB. Como criterio de selección, se utilizaron los 2 primeros miARNs para cada gen que tuvieran un score > 80 y que, por tanto, presentan una mayor complementariedad.

3.5. Búsqueda bibliográfica.

La información utilizada para la elaboración de este documento se basó en estudios experimentales y textos de carácter divulgativo extraídos de la plataforma *Pubmed*, perteneciente a la base de datos MEDLINE. También se consultaron páginas web de carácter oficial para la búsqueda de datos específicos. El referenciado a lo largo del texto de la bibliografía empleada se realizó utilizando la aplicación *Mendeley*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efectos de la dieta sobre la expresión de genes implicados en la adipogénesis.

Con el objetivo de ver el impacto de una dieta desequilibrada durante etapas tempranas del desarrollo sobre el mecanismo de adipogénesis en ratas, se analizaron mediante la técnica RT-PCR los niveles de expresión de 3 genes implicados en dicho proceso (*Pparg*, *Cebpa* y *Fasn*) en función del sexo, del tipo de dieta materna durante la lactancia (Control o CAF) y del tipo de dieta recibido durante la edad adulta (CD o WD) en cada uno de los 8 grupos (*Tabla 1*).

Para ello se realizó el cálculo $2^{\Delta Ct}$ usando los valores CT obtenidos a partir de *StepOne Plus Software* y utilizando un gen de expresión constitutiva para corregir la expresión de los genes implicados en la adipogénesis. En esta ocasión se utilizó el gen del inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanosa (GDI), ya que estudios previos de laboratorio de características similares habían demostrado su idoneidad como gen de expresión constitutiva en el tejido adiposo. De cara al análisis de datos y para ver la relación entre los distintos grupos de trabajo, se utilizó el grupo hembras-Control-CD como referencia, atribuyendo siempre a este grupo el valor de 100% de la expresión.

TABLA 1: Resumen de los 8 grupos de trabajo del diseño experimental

	Lactancia	Dieta adulta
Hembras	Control	CD
	CAF	CD
	Control	WD
	CAF	WD
Machos	Control	CD
	CAF	CD
	Control	WD
	CAF	WD

A partir de estos datos, se realizó la representación gráfica de los resultados obtenidos (*Figura 7*). Se estudió la existencia del efecto dieta materna durante la lactancia y el efecto de la dieta en la edad adulta, así como el efecto interactivo de ambas intervenciones sobre la expresión de los genes seleccionados. Esto último demostraría una posible implicación en como el hecho de estar amamantado por una madre que tuvo una dieta de cafetería durante el periodo de lactancia condiciona la respuesta a una dieta *western diet* en la edad adulta.

Para estudiar estos efectos se realizó un ANOVA de 2 factores de forma independiente para hembras y para machos. Por otro lado, para determinar si la expresión de estos genes era diferencial en hembras y machos, se realizó un análisis por pares empleando el test *U de Mann Whitney* entre machos y hembras para cada uno de los grupos experimentales. Esta prueba tuvo como finalidad estudiar más en detalle otros posibles efectos presentes entre 2 grupos de interés.

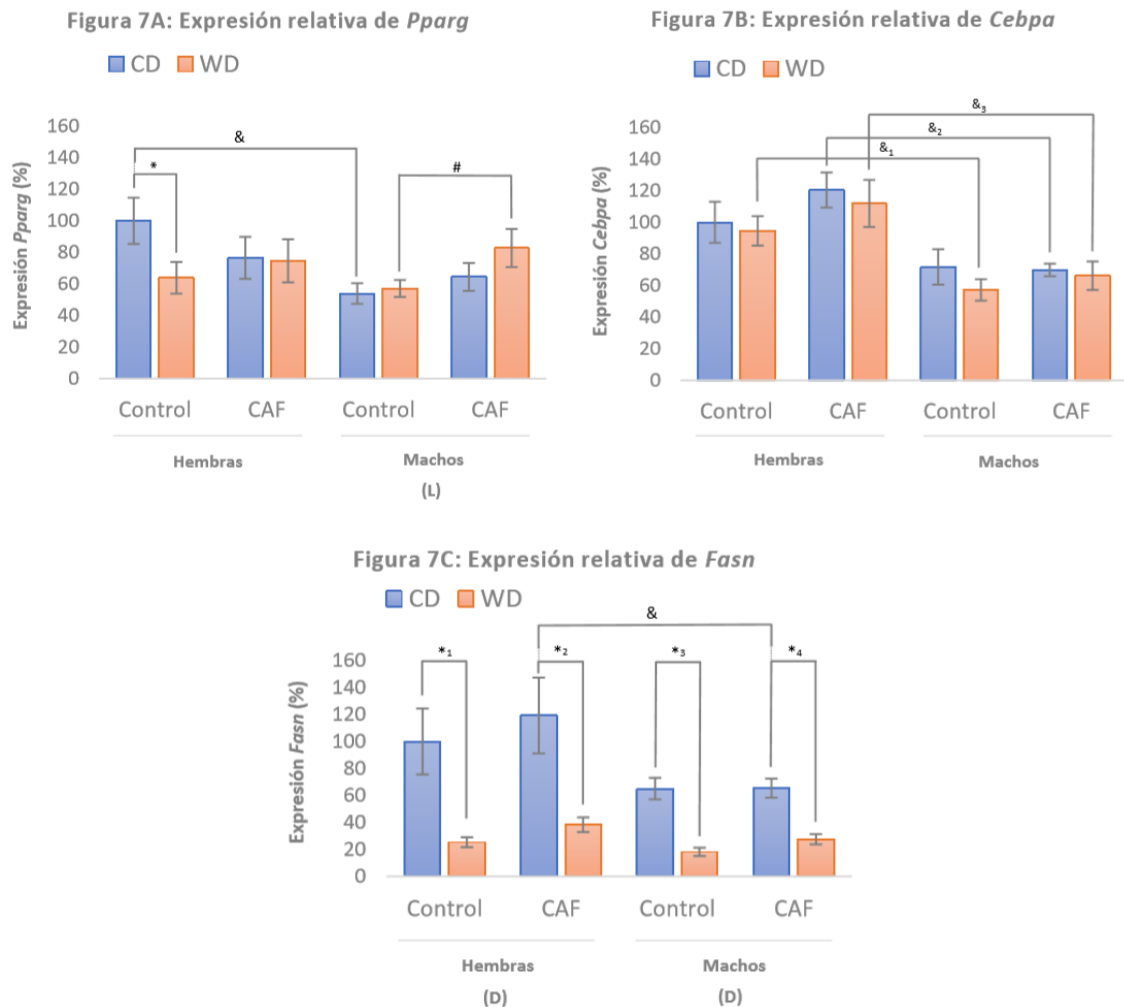


Figura 7: Representación gráfica de la expresión génica relativa en muestras de tejido adiposo de (7A) *Pparg* (7B) *Cebpa* y (7C) *Fasn*. Aparece representado el promedio de los resultados (% versus hembras control-CD) así como el error estándar de la media (\pm SEM) para cada uno de los 8 grupos del diseño experimental en función del sexo, tipo de dieta durante la lactancia (Control/CAF) y tipo de dieta durante la edad adulta (CD: dieta control/WD: western diet). Se representan también los posibles efectos observados mediante el test ANOVA ([L]-lactancia, [D]-dieta adulta) y el test *U de Mann Whitney* ([#]-lactancia, [*]-dieta adulta, [&]-sexo).

4.1.1. Cambios en la expresión de *Pparg*

Los resultados obtenidos para la variación de la expresión de *Pparg* en función del tipo de dieta materna durante la lactancia y de la dieta adulta en hembras y machos aparecen representados en la *Figura 7A*.

A través del análisis ANOVA de 2 factores, se observó un efecto dieta materna durante la lactancia estadísticamente significativo en ratas macho ($P=0.039$; L: efecto dieta materna durante la lactancia).

Las crías machos cuyas madres habían tenido una dieta cafetería durante la lactancia, presentaron en conjunto un aumento en los niveles de *Pparg* respecto a los animales control.

Coincidiendo con el efecto lactancia determinado a través del test ANOVA, dentro del grupo de machos cuyas madres habían recibido una dieta de cafetería durante el periodo de lactancia, se observó, esta vez a través del test *U de Mann Whitney*, un aumento de los niveles de *Pparg* respecto a los animales control. Este efecto estuvo presente de forma significativa en los animales que fueron alimentados con una *western diet* en la edad adulta ($P=0.049$; #: diferencia significativa entre grupos Control y CAF, test *U de Mann Whitney*). No se detectó un efecto de la dieta significativo ni tampoco un efecto interactivo entre ambas intervenciones.

No se observaron efectos significativos mediante el test ANOVA de 2 factores en hembras. Sin embargo, si se observaron efectos interesantes al realizar comparaciones por pares con el test *U de Mann Whitney*. En particular, las hembras cuyas madres recibieron una dieta control durante la lactancia, presentaron una disminución significativa de la expresión de *Pparg* debido a la ingesta de una *western diet* durante la edad adulta ($P=0.049$; *: diferencia significativa entre grupos CD versus WD, test *U de Mann Whitney*).

Al comparar el grupo de crías de rata cuyas madres habían ingerido una dieta control durante la lactancia y que tuvieron una dieta control en la edad adulta (Control-CD), se observaron diferencias significativas en la expresión de *Pparg* en función del sexo mediante el test *U de Mann Whitney*. En estas condiciones en las cuales no se realizó ningún tipo de intervención sobre la dieta, los niveles de *Pparg* fueron mayores en hembras respecto a los machos ($P=0.009$; &: diferencia significativa entre hembras y machos).

4.1.2. Cambios en la expresión de *Cebpa*

Los resultados obtenidos para la variación de la expresión de *Cebpa* en función del tipo de dieta materna durante la lactancia y de la dieta adulta en hembras y machos aparecen representados en la *Figura 7B*.

A través del análisis ANOVA de 2 factores, no se observaron efectos ni de la dieta materna durante la lactancia, ni de la dieta en la edad adulta ni tampoco del posible efecto interactivo entre ambas intervenciones ($P > 0.05$). Sin embargo, sí pudieron observarse efectos significativos cuando se analizó el efecto sexo mediante el test *U de Mann Whitney*.

De esta forma se pudo ver una expresión diferencial estadísticamente significativa de *Cebpa* entre hembras y machos en los grupos de individuos cuyas madres recibieron una dieta de cafetería durante la lactancia, con una menor expresión en el caso de los machos. Este efecto estuvo además presente independientemente del tipo de dieta consumido durante la edad adulta (CD o WD) ($P=0.008$, &₂: diferencia significativa entre machos y hembras en el grupo CAF-CD; $P=0.046$; &₃: diferencia significativa entre machos y hembras en el grupo CAF-WD). Esta disminución en los machos también se observó en el grupo de individuos cuyas madres tuvieron una dieta control durante la lactancia y una WD en la edad adulta ($P=0.005$; &₁: diferencia significativa entre machos y hembra en el grupo Control-WD).

4.1.3. Cambios en la expresión de *Fasn*

Los resultados obtenidos para la variación de la expresión de *Fasn* en función del tipo de dieta materna durante la lactancia y de la dieta adulta en hembras y machos aparecen representados en la *Figura 7C*.

El efecto más notable sobre la expresión de *Fasn* fue el producido por la dieta en la edad adulta. Estuvo presente tanto en hembras como en machos, produciéndose una disminución significativa de los niveles de expresión debido al consumo de una western diet en la edad adulta (Hembras: $P=0.001$, Machos: $P=0.000$; (D): efecto dieta adulta, ANOVA 2 factores).

Este efecto de la dieta adulta se vio además apoyado por los resultados obtenidos mediante el test *U de Mann Whitney*. Dentro de los grupos de ratas a cuyas madres se les había administrado el mismo tipo de dieta durante la lactancia, ya fuera control o cafetería, y tanto para hembras como para machos, se observó una disminución significativa de los niveles de *Fasn* debido a la ingesta de una *wester diet* durante la edad adulta (Hembras-Control: $P=0.004$, *₁; Hembras-CAF: $P=0.022$, *₂; Machos-Control, $P=0.001$, *₃; Machos-CAF: $P=0.005$, *₄; *: diferencia significativa entre dieta adulta CD y WD, test de U de Mann Whitney).

Otra diferencia significativa que mostró el test de U de Mann Whitney fue el presente entre ratas hembras y macho del grupo de ratas a cuyas madres se les dio una dieta de cafetería durante la lactancia y que fueron alimentadas con una dieta control en la edad adulta. Se pudo ver una menor expresión de *Fasn* en los machos respecto a las hembras ($P=0.049$; &: diferencia significativa entre machos entre machos y hembras).

Una western diet hace referencia a un tipo de dieta comercial cuya composición es conocida y que tiene como objetivo el aumento de peso. Se caracteriza por ser una dieta hipercalórica, rica en grasas (high-fat) y rica en azúcares simples (high-sucrose). Por otro lado, la dieta de cafetería también es una dieta rica en grasas y en azúcares simples. Sin embargo, tiene la peculiaridad de ser una dieta más variada, en la que cada animal come aquello que más le guste. Suelen incluirse alimentos energéticos y con un alto grado de palatabilidad. Sería por tanto más representativa de las condiciones asociadas a la obesidad en humanos.¹⁶

Como se ha detallado en el apartado [1.5.] (Tejido adiposo y adipogénesis) los factores PPAR γ y C-EBP α actúan en la fase final del proceso de adipogénesis, retroalimentándose y encargándose de regular otros factores necesarios para el metabolismo lipídico, entre los cuales encontramos la proteína FAS. Hay estudios que apoyan estas implicaciones al demostrar que la expresión de PPAR γ , y, por tanto, del resto de factores, aumenta durante el proceso de adipogénesis y que su sobreexpresión conduce a un aumento en la adiposidad. Además, modelos de ratones *knockout* para estos genes ven reducidos en gran medida su grado de adiposidad corporal respecto a animales control.¹⁷ En base a esto, se puede hipotetizar que un perfil alimentario que favorezca el desarrollo de la obesidad, como son una dieta de cafetería o una wester diet, pueden producir un aumento en la expresión de los 3 genes.

Actualmente existen evidencias que apoyan o no estas afirmaciones, así como los resultados obtenidos en el presente trabajo de fin de grado, y que se presentan a continuación.

Estudios realizados con modelos de roedores muestran como la descendencia de madres alimentadas con dietas hipercalóricas, como es la dieta de cafetería, durante el embarazo y durante el periodo de lactancia presentan un aumento en la expresión de *Pparg*. Este aumento se observó además tanto a nivel del ARNm del gen como del producto proteico codificado por el mismo, PPAR γ .¹⁷ Estos resultados apoyarían el efecto de la ingesta materna presente en nuestro diseño experimental, ya que también se observó un aumento en la expresión de *Pparg* en machos cuyas madres tuvieron una dieta de cafetería durante el periodo de lactancia (L). El hecho de que, en condiciones normales, el nivel de expresión de *Pparg* sea directamente proporcional al de *Cebpa* y *Fasn*, lleva a pensar el mismo grupo presentaría también un aumento en los niveles de expresión de ambos genes. Sin embargo, estos no se vieron afectadas de forma significativa por el tipo de dieta materna durante la lactancia. Pueden apreciarse tendencias, como en el caso del gen codificante para *Fasn*, cuya expresión parece aumentar en estas condiciones.

Según la bibliografía consultada, se ha descrito en estudios de características similares al presente que el aumento en la expresión de *Pparg* va acompañada de una disminución en los niveles de *Cebpa*, debido al consumo de una dieta rica en grasa (60% de lípidos) por parte de madres desde antes de la concepción, durante la gestación y la lactancia. Esto se ha relacionado con la modulación de los niveles de sus activadores o inhibidores transcripcionales. En la descendencia de estas madres, se han visto un aumento en los niveles del factor C-EBP β y una disminución de los niveles de SIRT1 y SRC1. Como ya se ha detallado, el factor C-EBP β estimularía la expresión tanto de PPAR γ como de C-EBP α , y por ende de FAS. Por otro lado, SIRT1 se trata de un inhibidor de PPAR γ , y SRC1 es un activador de C-EBP α . Por tanto, en condiciones de obesidad materna inducida por el consumo de una dieta desequilibrada durante etapas clave del desarrollo, parece que el efecto final de la regulación génica de la descendencia hace que los niveles de PPAR γ se vean aumentados en comparación con los de C-EBP α , que se verían reprimidos.¹⁷

Un efecto interesante que pudo observarse fue el cómo la expresión de *Pparg* a una western diet fue distinta en función de si la madre tuvo o no una dieta de cafetería durante la lactancia, siendo mayor su expresión cuando se recibió una dieta de cafetería. Refleja la posible programación metabólica entre el estado nutricional materno y en este caso, una mayor expresión de *Pparg*. Este aumento de PPAR γ es coherente a nivel metabólico ya que en estas condiciones serán necesarios elementos involucrados en el metabolismo glucídico y lipídico que se ven regulados positivamente por PPAR γ a nivel transcripcional. Entre estos encontramos la ya mencionada ácidos graso sintasa (FAS), transportadores como FABP, la lipoproteína lipasa (LPL) o la adiponectina, que aumenta la sensibilidad a la insulina, mejorando la captación de glucosa.²⁹⁻³² A pesar de que en los resultados obtenidos no se observó de manera significativa un aumento en la expresión de *Fasn*, si hubo un tendencia que podría relacionarse con este efecto.

La disminución en los niveles de expresión de *Cebpa* a los cuales se hace referencia en los estudios consultados no corrobora el aumento observado en nuestro diseño experimental. Sin embargo, se pueden encontrar otros estudios de características similares que demuestran lo contrario: que la descendencia de ratas a las que se les había dado una dieta hipercalórica rica en grasas durante el embarazo y la lactancia, descienden los niveles de PPAR γ en hembras al mismo tiempo que aumentan los de C/EBP β y C/EBP α .^{15,32}

Los mismos estudios apoyan los resultados estadísticamente significativos obtenidos a través del efecto de la dieta observado en la expresión de *Fasn* en este trabajo, que se ve disminuida debido a una *western diet* en la edad adulta (D). También se observó un efecto de la dieta al reducir la expresión de *Pparg* en el grupo de hembras control (*), así como una tendencia en los niveles de *Cebpg* a disminuir en respuesta a una *western diet* durante la edad adulta, aunque esta última de manera no significativa.¹⁷

Por tanto, bajo estas condiciones de obesidad inducida en la edad adulta, tanto en los resultados obtenidos como en los consultados se observa una disminución en el nivel de expresión de los 3 genes estudiados. Las investigaciones más específicas consultadas demuestran además que la disminución se produce tanto a nivel del transcrito como del producto codificado de estos genes, lo que produce una alteración sobre el metabolismo normal de los adipocitos.^{15,33} Aunque disminuyan los niveles de PPAR γ , C-EBP α o FAS en estas condiciones en las cuales se administra una *western diet* durante la edad adulta, que tiene como objetivo el engorde, se produce de manera permanente una expansión del tejido adiposo a través del mecanismo de hipertrofia. Este, como se ha visto, tiene consecuencias negativas sobre el funcionamiento del propio tejido como la hipoxia debido al insuficiente nivel de angiogénesis. Esta falta de oxígeno facilita además la reacción inflamatoria sobre este tejido. Se inhibe la formación de nuevos adipocitos y aumentan el tamaño de los ya existentes, lo cual puede tener consecuencias como el desarrollo de diabetes tipo 2, muy asociada al fenotipo obeso.³³

Actualmente se comercializan agonistas de PPAR γ , como las tiazolidinedionas (TZDs), que tienen como objetivo aumentar el número de adipocitos, disminuyendo así el tamaño de los ya existentes, favoreciendo por tanto la hiperplasia o adipogénesis para combatir la hiperfagia patológica del tejido.¹⁵

Pueden existir diferencias en el proceso de adipogénesis en función del sexo. Esto se debe a la presencia de elementos de respuesta a hormonas esteroideas en genes que codifican para factores participantes de la adipogénesis y del desarrollo a la obesidad. Estas hormonas, mayoritariamente presentes en hembras, harán que exista un efecto diferencial en función del sexo.¹⁵

En este estudio hemos observado que hay cambios significativos en las diferentes condiciones o grupos del diseño experimental para la expresión de *Pparg*, *Cebpa* y *Fasn* entre hembras y machos. Sin embargo, otros estudios consultados que siguieron condiciones similares no corroboran estos resultados. Según estos, la diferencia entre sexos no es significativa en los genes, ni tampoco lo es el nivel de adiposidad global. Señalan una posible tendencia sobre los niveles de *Cebpa* a ser mayores en hembras que en machos, aunque no se muestra de manera significativa, como sí lo fueron los obtenidos en este estudio.^{15,32}

Como se ha podido comprobar, existen discrepancias entre los resultados esperados, los obtenidos y los consultados con otros estudios de características similares al que se llevó a cabo. Una posible explicación a la heterogeneidad de los resultados obtenidos pueden ser las diferencias en cuanto a la composición de las dietas usadas en cada estudio. En este tipo de intervenciones evidentemente entrarán en juego múltiples variables que influyan en el resultado final, pero debido a las características del estudio, el tipo de dieta tendrá una importancia mayoritaria sobre el resto. Los resultados de los diferentes estudios resultarían más equiparables si en todos los casos se hubiera usado exactamente la misma composición en cuanto a la dieta administrada.

4.2. Posible papel de miARNs de interés sobre genes implicados en la adipogénesis

Ya se ha indicado la forma en la que una dieta desequilibrada o la obesidad *per se* por parte de la madre pueden tener un efecto sobre el proceso de adipogénesis en la progenie, siendo uno de los caminos la transmisión de un perfil desequilibrado en los miARNs. En condiciones saludables en las que se sigue una dieta equilibrada, se establece un perfil de miARNs determinado que promueve el correcto funcionamiento del proceso de adipogénesis, algo que podría verse alterado en condiciones de obesidad.³³ Estos miARNs no solo pueden tener un efecto sobre la regulación postranscripcional de los genes directamente involucrados en el proceso, sino que también se verán afectados factores secundarios que a su vez modulan la expresión de estos genes.²⁹

A través de un análisis *in silico* usando la base de datos miRDB se obtuvieron los miARNs que presentan mayor complementariedad con los genes estudiados, lo cual se representa por el valor de score.³⁴ Gracias a esto y a la bibliografía consultada, se hizo una recopilación de las principales familias de miARNs que podrían estar implicadas en la regulación de la expresión de *Pparg*, *Cebpa* y *Fasn* a nivel postranscripcional, centrando la atención en las familias más destacadas y relacionadas con la obesidad, así como otras de interés cuyo estudio en un futuro pueda resultar de interés.

4.2.1. Regulación transcripcional de *Pparg* por miARNs en condiciones de obesidad

A partir de la información aportada por la base de datos miRDB, se obtuvo que la familia de miARNs miR-27, que incluye miR-27a y miR-27b, presenta la mayor complementariedad con el transcrito del PPAR γ para *Rattus Norvegicus*, lo que se representa con un valor de score de 94. Otros ejemplos de miARNs que tienen como diana el transcrito de *Pparg*, ordenados de manera decreciente en función de su grado de complementariedad o score son miR-130, miR-301, miR-128, miR-451, miR-338, miR-673 y miR-340.

4.2.2. Regulación transcripcional de *Cebpa* por miARNs en condiciones de obesidad

De nuevo a partir de la información consultada en miRDB, se obtuvo que miR-369 y la familia miR-190 (a y b) eran los que presentaban una complementariedad mayor al transcrito o ARNm del C-EBP α para *Rattus Norvegicus*, lo que se representa por unos valores de score de 95 y 92 respectivamente.

Otros ejemplos de miARNs que tienen como diana el transcrito de *Cebpa*, ordenados de manera decreciente en función de su grado de complementariedad o score son miR-101a, miR-101b, miR-182a, miR-31a, miR-3586, miR-3592, miR-3126, miR-664-1, miR-664-2, miR-124 y miR-339.

4.2.3. Regulación transcripcional de *Fasn* por miARNs en condiciones de obesidad

Por último, a partir de la información consultada en miRDB, se obtuvo que miR-335 y miR-15 (a y b) eran los que presentaban una complementariedad mayor al transcrito o ARNm del gen *Fasn* para *Rattus Norvegicus*, con unos valores de score de 90 y 89 respectivamente.

Otros ejemplos de miARNs que tienen como diana el transcrito de *Fasn*, ordenados de mayor a menor en función de su grado de complementariedad o score son miR-16, miR-195, miR-497, miR-322, miR-185, miR-92, miR-3558, miR-24, miR-615, miR-20b, miR-17-1 y miR-216a.

A partir de la anterior información recogida, se podría pensar que todos los miARNs mencionados tendrán potencialmente un papel en el proceso de adipogénesis al tener como dianas algunos de los genes principalmente implicados en este proceso. Esto también hace pensar que alteraciones en los niveles de cualquiera de ellos debido a una dieta desequilibrada en periodos fundamentales del desarrollo como la lactancia o posteriormente en la edad adulta, pueden producir complicaciones asociadas al tejido adiposo comprometiendo su correcto funcionamiento. Tendrían por tanto un posible papel en el desarrollo de la obesidad. Sin embargo, actualmente no existen evidencias científicas que demuestran el papel de cada uno de ellos en el desarrollo del fenotipo obeso, ni tampoco la variación de sus niveles en función de la dieta o la obesidad *per se*. A continuación, se presentan los hallazgos más significativos en cuanto a las implicaciones de los miARNs que tienen un mayor grado de complementariedad para *Pparg*, *Cebpa*, *Fasn* y cuyo papel está descrito en el desarrollo del fenotipo obeso según la bibliografía consultada.

Los miARNs que más complementariedad presentaron para el transcrito que codifica para el factor PPAR γ fue la familia miR-27, compuesta por miR-27a y miR-27b. Ambos se consideran reguladores negativos de la adipogénesis, razón por la cual, cuando ocurre el proceso fisiológico de diferenciación de adipocitos, han de estar ausentes. Su forma de regular negativamente la adipogénesis es la unión a la región 3'UTR del transcrito que codifica para el factor PPAR γ , inhibiendo de esta forma su traducción. Esta inhibición del proceso puede demostrarse mediante la expresión ectópica de miR-27a o miR-27b en modelos celulares *in vitro*, lo cual se ha mostrado que reduce la acumulación de triglicéridos. El mismo estudio demuestra además que esta familia de miARNs se ve incrementada en el tejido adiposo de ratones obesos, lo que supondrá una desregulación de los niveles de PPAR γ . Esto provoca una disminución de la adipogénesis, estimulando la expansión del tejido adiposo a través de la hipertrofia de los adipocitos preexistentes, con las consecuentes alteraciones asociadas a este proceso ya comentadas.^{20,33} Relacionándolo con los resultados desarrollados en el apartado [4.1.] (Efectos de la dieta sobre la expresión de genes implicados en la adipogénesis), se indicaba como los niveles de expresión de *Pparg* se veían disminuidos en condiciones de obesidad inducida por la dieta siendo una posible causa el aumento de esta familia de miARNs. Un desequilibrio en el perfil de miR-27a y miR-27b debido a una dieta desequilibrada potenciaría la expansión del tejido adiposo por el mecanismo de hipertrofia debido al silenciamiento génico de *Pparg*.

Existen otros ejemplos de miARNs que regulan el proceso de adipogénesis a nivel del *Pparg*, ya sea potenciando o inhibiendo su expresión. Además, pueden ejercer su acción directamente sobre el propio gen o sobre otros factores que se encuentren a su vez regulando su expresión. Entre estos se destaca la acción de miR-130 y miR-138 en ratas. La elevación registrada de sus niveles como consecuencia de la obesidad tiene un papel inhibitorio sobre *Pparg*, por lo que, al igual que miR-27a o miR-27b estarán ausentes en el progreso del mecanismo normal de adipogénesis.³³ En concreto, miR-130, que según miRDB tiene un alto grado de complementariedad para el transcrito de PPAR γ , se unen a su región 3'UTR, mientras que miR-138 inhibe la expresión de PPAR γ de manera indirecta a través de la regulación de cofactores transcripcionales que tiene como función potenciar la transcripción de PPAR γ .^{20,33} Esto explica el hecho de que miR-138 no aparezca en la

lista de miARNs que tienen como diana el transcrito de PPAR γ en miRDB, ya que no actúan directamente sobre él, pero sí de manera indirecta en condiciones de obesidad. Otros miARN cuyo aumento en condiciones de obesidad produce una disminución del PPAR γ de manera indirecta a través del silenciamiento de sus intermediarios son miR-448, que tiene como diana KLF5, regulador positivo de *Pparg*, u otros como miR-155, miR-132 o miR-124, que actúan sobre C-EBP β , activador de C-EBP α y PPAR γ .²⁰

Por otro lado, se han descrito también una serie de miARN encargados de favorecer el proceso de diferenciación de adipocitos, con un efecto lipogénico al aumentar la expresión de PPAR γ . Por tanto, su presencia en condiciones normales es necesaria para el éxito del proceso. Cuando se produzca la expansión del tejido adiposo por el mecanismo de hipertrofia, sus niveles se verán disminuidos. Entre ellos encontramos miR-103, miR-143, miR-200, miR-335 y miR-375, para los cuales la expresión ectópica en modelos in vitro estimula la acumulación de triglicéridos en preadipocitos de manera paralela al aumento de la expresión de PPAR γ .^{20,29}

No se han encontrado evidencias significativas descritas del posible efecto de miR-369 o miR-190 sobre el transcrito de C-EBP α en relación con el proceso de adipogénesis o el desarrollo de la obesidad. Algunos estudios sí señalan el papel de miR-369 por sus implicaciones sobre el metabolismo del tejido adiposo, ya que otra de sus dianas es el transcrito del transportador de ácidos grasos FABP. Sin embargo, no se ha encontrado ninguna relación con su efecto a nivel del *Cebpa*.^{21,25} Otro de los miARN que presentó un grado considerable de complementariedad con este transcrito fue miR-124. Se han descrito consecuencias de su acción al producir silenciamiento génico de *Cebpa*, pero no a nivel del tejido adiposo o en relación con la adipogénesis, sino en otros procesos en los cuales está implicado el factor C-EBP α .³⁵ Esto evidentemente no significa que no tenga efectos sobre la adipogénesis, sino que, a día de hoy, no han sido estudiados o descritos.

En el caso del gen que codifica para FAS, de nuevo no se han encontrado descritas implicaciones de los miARNs que según miRDB presentaron una mayor complementariedad sobre su transcrito; miR-335 o miR-15. Una aproximación al proceso de adipogénesis se describe en estudios que demuestran que un aumento en los niveles de miR-335 estimulan la diferenciación a osteoblastos.³⁶ Los osteoblastos, como se mencionó en el apartado [1.4.2.] ('Mecanismos de expansión del tejido adiposo'), tienen el mismo precursor mesenquimático que los preadipocitos, y en función de las señales que éste reciba, se diferenciará a un tipo celular u otro. Por tanto, miR-335 al ejercer su efecto de silenciamiento génico podría favorecer que la diferenciación estuviera enfocada a la obtención de osteoblastos y no de adipocitos. Sin embargo, en el estudio no se especifica que su acción se produzca a nivel del transcrito de la FAS.³⁶ Otro de los miARNs que aparecieron como diana de FAS, aunque con menos complementariedad, fue miR-195. Según la bibliografía consultada, este miARN se encuentra regulando la expresión de genes relacionados con la síntesis de lípidos y su captación procedentes de la dieta y su acción se ve comprometida en condiciones de obesidad, lo que provocaría la deposición de grasa sobre tejidos como el hígado.³⁷ Otros estudios señalan miR-122 y miR-370 como reguladores positivos de la expresión de FAS, lo cual probablemente se lleve a cabo de manera indirecta por medio de sus reguladores y no a nivel del propio transcrito de Fasn ya que no aparece en miRDB como uno de los que mayor complementariedad presentan.²⁰

Como se ve, el papel de la FAS se ha enfocado más a su relación con las patologías asociadas a la deposición de grasa sobre los órganos, como es el caso de la esteatosis hepática o hígado graso, pero no tanto, o al menos actualmente, a la obesidad. Se propone como un posible agente terapéutico para tratar la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD).^{36 37}

Los resultados obtenidos para los miARNs que se encuentran regulando *Cebpa* y *Fasn* resultan poco esclarecedores en cuanto al papel real que desempeñan en el proceso real. Sin embargo, esto no descarta su posible implicación en dicha enfermedad y que se deba seguir trabajando para comprender el papel que juega en la adipogénesis la proteína en sí y los miARNs que regulan su expresión en el complejo mecanismo de adipogénesis.

En función de lo que se ha visto a través del análisis *in silico* y de la bibliografía consultada, resultaría interesante comprobar de manera experimental los efectos de miR-27a o miR-27b, ya que, de los comentados, parecen ser los que tienen una relación más directa o definida para la relación entre adipogénesis y una dieta desequilibrada o la obesidad *per se*.

A través de una RT-PCR, podrían estudiarse los niveles de expresión de cualquiera de estos miARNs en muestras procedentes de ratas cuyas madres tuvieron una dieta desequilibrada durante la lactancia y que después tuvieron una dieta desequilibrada durante la edad adulta, siguiendo así el diseño o modelo experimental empleado. Los niveles obtenidos podrían entonces relacionarse con los resultados comentados para la expresión de, en este caso, *Pparg* en función de las intervenciones elegidas y que presentaron un impacto sobre el proceso normal de adipogénesis.

De cara a futuras investigaciones será interesante determinar si inhibidores de determinados miRNAs o miméticos pueden emplearse como agentes terapéuticos con el objetivo de asegurar el éxito en el proceso de adipogénesis y bloqueando el desarrollo de la obesidad. Actualmente existen fármacos, como las ya comentadas TZDs que ejercen una función mimetizante de PPAR γ , pero con los miARNs se incorpora una nueva herramienta que ya sea por sus propiedades como biomarcador preventivo o como agente terapéutico, ayuden a esclarecer nuevas formas para el control del fenotipo obeso y todas las patologías asociadas.

4.3. Resultados obtenidos para la búsqueda bibliográfica.

Para la realización del presente trabajo de fin de grado, se intentó abordar la recopilación de información desde 3 frentes: el proceso de adipogénesis, el fenómeno de programación metabólica, y el papel de los miARNs. Se empleó Pubmed como principal motor de búsqueda debido a que el campo a tratar se incluye dentro de la investigación biomédica. Como criterio de selección, se emplearon publicaciones con un máximo de 5 años de antigüedad, con el objetivo de transmitir la información más actualizada. Sin embargo, se incluyeron estudios, sobre todo experimentales, que sobrepasaban este límite pero que se consideró que hacían una contribución sustancial al estudio.

A parte de las búsquedas realizadas, se incluye información procedente de artículos citados en las publicaciones, así como otros cuya lectura fue recomendada por su similitud. A partir de la integración de la información proporcionada por estos resultados se redactaron los primeros borradores que luego se detallaron mediante búsquedas concretas en función de la información específica que requería más atención.

Las principales búsquedas detalladas, presentándose por la palabra clave empleada, fueron:

- '*Adipogenesis*': Se obtuvo un total de 12026 resultados. A partir de estos se aplicaron filtros para acotar la búsqueda. Solo se tuvieron en consideración reviews que incluyeran la palabra '*adipogenesis*' en el título y que hubieran sido publicadas en los últimos 5 años. Se obtuvo así un total de 63 publicaciones, cuyo posterior criterio de selección fue la lectura del título y/o abstract, considerando solo aquellas que tuvieran relación directa con el objetivo de este trabajo. Se llegó así a un total de 18 resultados, los cuales aparte de abordar lo referente al proceso de adipogénesis, también incluyeron información utilizada sobre la programación metabólica y las implicaciones de los miARNs, lo cual facilitó mucho las búsquedas posteriores.
- '*Maternal obesity*': Se obtuvieron en total 12003 resultados. Se acotó la búsqueda solo a aquellas publicaciones que presentaran 'offspring' en el título y cuya publicación datara de los últimos 5 años. El resultado final fueron 80 resultados, pero con la información obtenida a partir de la lectura de los 3 resultados principales, fue suficiente.

No hubo una búsqueda para las implicaciones de los miARNs, ya que las publicaciones escogidas ya aportaron la información necesaria. Sin embargo, si se hicieron búsquedas específicas para el papel concreto de cada uno de los miARNs aportados por la base de datos miRDB, con el objetivo de conocer su implicación sobre la adipogénesis y la aparición de la obesidad.

5. CONCLUSIONES

A partir de la información recopilada y expuesta en el presente trabajo de fin de grado, pueden resaltarse las siguientes ideas clave en lo referente a los miARNs y la obesidad:

- Importancia de una dieta equilibrada por parte de la madre durante las etapas clave del desarrollo, ya que lo contrario puede provocar alteraciones como las estudiadas en este caso a nivel del proceso de adipogénesis, modificando la expresión de algunos de los principales genes implicados en dicho proceso.
- Se han podido observar diferentes efectos sobre la expresión de *Pparg*, *Cebpa* y *Fasn*: efecto lactancia y efecto de la dieta adulta, así como otros posibles efectos específicos del sexo del animal en cuestión.
- Se ha descrito el papel de los miARNs en la programación metabólica entre la madre y la descendencia a la obesidad, incluyendo las evidencias científicas actuales de los miARNs con un mayor grado de complementariedad con los genes estudiados. Se destaca la familia miR-27, cuyo estudio en profundidad podría resultar de interés.

En conjunto, se ha podido comprobar la influencia del estatus nutricional materno sobre el proceso de adipogénesis en la descendencia como factor de riesgo para el desarrollo de la obesidad. Se destacan los miARNs presentes en fluidos biológicos como la leche materna como herramienta preventiva, diagnóstica y terapéutica. Sin embargo, es necesario destacar la importancia de futuras y permanentes investigaciones que permitan conocer y explotar todo su potencial en relación con la obesidad y al resto de patologías en cuyo desarrollo se encuentran involucrados.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Ghaben, A. L. & Scherer, P. E. Adipogenesis and metabolic health. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 20 242–258 (2019).
2. Jorge Abondano, F. L. Epigenética en el orgine de la Obesidad: Perspectiva desde la célula grasa. *Revista colombiana de Endocrinología Diabetes&Metabolismo* https://www.researchgate.net/publication/331355182_Epigenetica_en_el_orgine_de_la_Obesidad_Perspectiva_desde_la_celula_grasa/citation/download (2017).
3. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es> <https://www.who.int/es> (2020).
4. Pérez López, J. Estudio del papel de miR-148a en la regulación de genes del metabolismo lipídico y la adipogénesis. *Tesis en acceso abierto la Univ. Cantab.* (2016).
5. Kuri-Harcuch, W., Velez-delValle, C., Vazquez-Sandoval, A., Hernández-Mosqueira, C. & Fernandez-Sanchez, V. A cellular perspective of adipogenesis transcriptional regulation. *J. Cell. Physiol.* **234**, 1111–1129 (2019).
6. Diabetes y el embarazo. [medlineplus.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35812342/) (2020).
7. Li, Y. Epigenetic mechanisms link maternal diets and gut microbiome to obesity in the offspring. *Frontiers in Genetics* vol. 9 (2018).
8. Menichini, D., Longo, M. & Facchinetti, F. Maternal interventions to improve offspring outcomes in rodent models of diet-induced obesity: a review. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* vol. 32 2943–2949 (2019).
9. Patel, N., Pasupathy, D. & Poston, L. Determining the consequences of maternal obesity for offspring health. *Experimental Physiology* vol. 100 1421–1428 (2015).
10. Hoepner, L. A. Bisphenol a: A narrative review of prenatal exposure effects on adipogenesis and childhood obesity via peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Environmental Research* vol. 173 54–68 (2019).
11. von Ehr, J. & von Versen-Höynck, F. Implications of maternal conditions and pregnancy course on offspring's medical problems in adult life. *Arch. Gynecol. Obstet.* **294**, 673–679 (2016).
12. Pereira, T. J., Moyce, B. L., Kereliuk, S. M. & Dolinsky, V. W. Influence of maternal overnutrition and gestational diabetes on the programming of metabolic health outcomes in the offspring: Experimental evidence¹. *Biochemistry and Cell Biology* vol. 93 438–451 (2015).

13. Massieu Helguera Núm, G., Heredia-Melo, L., Castañón-Sánchez, C. A. & Marchat, L. A. *Los microRNA: nuevos actores en la obesidad. Artículo de revisión* vol. 8 www.medigraphic.org.mx www.medigraphic.com/emis www.medigraphic.org.mx (2015).
14. Zamanillo, R., Sánchez, J., Serra, F. & Palou, A. Breast milk supply of microRNA associated with leptin and adiponectin is affected by maternal overweight/obesity and influences infancy bmi. *Nutrients* **11**, (2019).
15. Almeida, M. M. *et al.* Perinatal maternal high-fat diet induces early obesity and sex-specific alterations of the endocannabinoid system in white and brown adipose tissue of weanling rat offspring. *Br. J. Nutr.* **118**, 788–803 (2017).
16. George, G. *et al.* The impact of exposure to cafeteria diet during pregnancy or lactation on offspring growth and adiposity before weaning. *Sci. Rep.* **9**, 1–9 (2019).
17. Desai, M., Jellyman, J. K., Han, G., Lane, R. H. & Ross, M. G. Programmed regulation of rat offspring adipogenic transcription factor (PPAR γ) by maternal nutrition. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **6**, 530–538 (2015).
18. Andrey Turchinovich, Ludmila Weiz, Anne Langheinz, B. B. Characterization of Extracellular Circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* **39**, 7223–7233 (2011).
19. A. McGregor, R. & S. Choi, M. microRNAs in the Regulation of Adipogenesis and Obesity. *Curr. Mol. Med.* **11**, 304–316 (2011).
20. Peng, Y. *et al.* MicroRNAs: Emerging roles in adipogenesis and obesity. *Cellular Signalling* vol. 26 1888–1896 (2014).
21. Jansen, J., Greither, T. & Behre, H. M. Androgen-regulated microRNAs (Andromirs) as novel players in adipogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 (2019).
22. Arentson-Lantz, E. J., Zou, M., Teegarden, D., Buhman, K. K. & Donkin, S. S. Maternal high fructose and low protein consumption during pregnancy and lactation share some but not all effects on early-life growth and metabolic programming of rat offspring. *Nutr. Res.* **36**, 937–946 (2016).
23. Hafidi, M. El, Buelna-Chontal, M., Sánchez-Muñoz, F. & Carbó, R. Adipogenesis: A necessary but harmful strategy. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 (2019).
24. Karagoz, H., Zor, F., Goktas, E. & Gorantla, V. S. Adipogenesis for soft tissue reconstruction. *Current Opinion in Organ Transplantation* vol. 24 598–603 (2019).
25. Bork, S. *et al.* Adipogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells is down-regulated by microRNA-369-5p and up-regulated by microRNA-371. *J. Cell. Physiol.* **226**, 2226–2234 (2011).

26. Yang, J., Eliasson, B., Smith, U., Cushman, S. W. & Sherman, A. S. The size of large adipose cells is a predictor of insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Obesity* **20**, 932–938 (2012).
27. De sá, P. M., Richard, A. J., Hang, H. & Stephens, J. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Compr. Physiol.* **7**, 635–674 (2017).
28. Jones, S. F. & Infante, J. R. Molecular pathways: Fatty acid synthase. *Clin. Cancer Res.* **21**, 5434–5438 (2015).
29. Huang, Q. *et al.* Mechanistic insights into the interaction between transcription factors and epigenetic modifications and the contribution to the development of obesity. *Frontiers in Endocrinology* vol. 9 (2018).
30. S, C., YJ, K., SJ, Y., Y, L. & M, L. Nutrigenomic Functions of PPARs in Obesogenic Environments. *PPAR Res.* **2016**, (2016).
31. Bayol, S. A., Simbi, B. H., Bertrand, J. A. & Stickland, N. C. 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 (2008).
32. Borengasser, S. J. *et al.* Maternal obesity enhances white adipose tissue differentiation and alters genome-scale DNA methylation in male rat offspring. *Endocrinology* **154**, 4113–4125 (2013).
33. Motawi, T. K., Shaker, O. G., Ismail, M. F. & Sayed, N. H. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma in Obesity and Colorectal Cancer: The Role of Epigenetics. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
34. Yuhao, C. & Xiaowei, W. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* **48**, 127–131 (2020).
35. Yu, A. *et al.* MiR-124 contributes to M2 polarization of microglia and confers brain inflammatory protection via the C/EBP- α pathway in intracerebral hemorrhage. *Immunol. Lett.* **182**, 1–11 (2017).
36. Zhang, L. *et al.* Overexpression of MiR-335-5p Promotes Bone Formation and Regeneration in Mice. *J. Bone Miner. Res.* **32**, 2466–2475 (2017).
37. Guo, J. *et al.* Ultraconserved element uc.372 drives hepatic lipid accumulation by suppressing miR-195/miR4668 maturation. *Nat. Commun.* **9**, 1–15 (2018).