



**Universitat**  
de les Illes Balears

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

# **EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN EN CRÍAS DE RATA DURANTE LA LACTANCIA CON UN COMPUESTO BIOACTIVO PRESENTE EN LA LECHE MATERNA SOBRE LA CAPACIDAD TERMOGÉNICA EN EDAD ADULTA**

**Sofía Villanueva Calle**

**Grado de Bioquímica**

**Facultad de Ciencias**

**Año Académico 2019-20**



# **EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN EN CRÍAS DE RATA DURANTE LA LACTANCIA CON UN COMPUESTO BIOACTIVO PRESENTE EN LA LECHE MATERNA SOBRE LA CAPACIDAD TERMOGÉNICA EN EDAD ADULTA**

**Sofía Villanueva Calle**

**Trabajo de Fin de Grado**

**Facultad de Ciencias**

**Universidad de las Islas Baleares**

**Año Académico 2019-20**

Palabras clave del trabajo:

Obesidad, lactancia, leche materna, mioinositol, programación metabólica, termogénesis, proteína desacoplante 1, tejido adiposo marrón

*Nombre Tutor/Tutora del Trabajo: Catalina Picó Segura*

*Nombre Tutor/Tutora (si procede)*

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 type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>



# ÍNDICE

Resumen/Abstract .....	1
<b>1. Introducción .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. La obesidad: una epidemia global .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Efecto del ambiente nutricional durante la etapa perinatal sobre la programación metabólica en la edad adulta. ....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Lactancia y compuestos de interés de la leche materna .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.1. Composición de la leche materna .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.1.1. Mioinositol .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4. El tejido adiposo marrón y la termogénesis .....</b>	<b>9</b>
<b>2. Objetivo y diseño experimental .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Objetivo .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Diseño experimental .....</b>	<b>11</b>
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Experimentación animal .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Determinación de la expresión génica de <i>Ucp1</i> en TAM mediante RT-PCR a tiempo real .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.1. Extracción de ARN .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.2 Cuantificación del ARN .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.3 Retrotranscripción .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.4 PCR a tiempo real .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.5 Análisis de los resultados .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3 Determinación de los niveles de la proteína de desacoplamiento 1 (UCP1) en TAM mediante <i>western blot</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.1 Extracción de proteínas de la muestra .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.2 Cuantificación de la proteína total .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3.3 Preparación de las muestras para cargarlas en el gel .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3.4 Electroforesis, electrotransferencia, inmunodetección y escaneado de membranas. ....</b>	<b>17</b>
<b>3.4 Análisis estadístico .....</b>	<b>17</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Peso corporal, grasa corporal y peso y proporción de proteínas del tejido adiposo marrón .....</b>	<b>18</b>
<b>4.2 Expresión génica de <i>Ucp1</i> en el tejido adiposo marrón .....</b>	<b>19</b>
<b>4.3 Niveles proteicos de UCP1 en el tejido adiposo marrón .....</b>	<b>20</b>
<b>5. Discusión .....</b>	<b>21</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>25</b>
<b>7. Agradecimientos .....</b>	<b>26</b>
<b>8. Bibliografía .....</b>	<b>27</b>

## RESUMEN

La gestación y la lactancia constituyen etapas críticas durante el desarrollo de un individuo. Esto es debido a que gran parte de los eventos de programación metabólica tienen lugar en este periodo y, en función de los cambios que se experimenten, aumentará o disminuirá la predisposición a padecer problemas de salud en la edad adulta. Por este motivo es importante controlar el estado nutricional de la madre, ya que podría tener repercusiones negativas en la descendencia. El estudio de la leche materna resulta de interés, puesto que se ha visto que algunos de sus componentes pueden contribuir al establecimiento de un fenotipo más saludable de la descendencia en la edad adulta. En un estudio de investigación realizado en el grupo de Nutrigenómica y Obesidad de la UIB se observó que el mioinositol se encontraba en concentraciones elevadas en la leche de ratas sometidas a una restricción calórica moderada durante la lactancia. Dicha restricción resulta en el establecimiento de un fenotipo más saludable de la descendencia en la edad adulta, por lo que, en el presente estudio, se pretende determinar si el mioinositol podría jugar un papel importante en los eventos de programación metabólica durante la lactancia. Para ello, se han utilizado dos grupos de ratas *Wistar*, que han permitido la comparación de un grupo control con un grupo suplementado con dosis fisiológicas de mioinositol durante la lactancia, y en ambos sexos. Se ha estudiado el peso y la composición corporal, así como los niveles proteicos de la proteína desacoplante 1 (UCP1) y la expresión génica de *Ucp1* en el tejido adiposo marrón (TAM) mediante la realización de un *western blot* y una RT-PCR a tiempo real, respectivamente, a los 7 meses de edad. Estos parámetros han sido analizados con el objetivo de determinar si el mioinositol durante la lactancia podría estar implicado en la programación del TAM y afectar a la capacidad termogénica de los animales. Los resultados obtenidos parecen poner de manifiesto un dimorfismo sexual con respecto al efecto de la suplementación con mioinositol durante la lactancia. En concreto, aunque no se observen cambios en el peso corporal de los animales, sí se aprecia tanto un incremento en la masa magra, como una tendencia a una mayor expresión de *Ucp1* en machos suplementados con mioinositol en comparación con el grupo control, aunque sin cambios en los niveles de la proteína UCP1. Sin embargo, en las hembras suplementadas con mioinositol no se detectan cambios con respecto a las del grupo control en los parámetros determinados.

## ABSTRACT

Pregnancy and lactation are critical stages during the development of an individual. This is due to the fact that the vast majority of metabolic programming events take place in this period and, depending on the changes that are experienced, the predisposition to suffer health problems in adulthood will increase or decrease. For this reason, it is important to monitor the nutritional status of the mother, since it could have negative repercussions on the offspring. The study of breastmilk is of interest, since it has been seen that some of its components can contribute to the establishment of a healthier phenotype of offspring in adulthood. In a research study carried out in the Nutrigenomics and Obesity group at the UIB, it was observed that myoinositol was found in high concentrations in the milk of rats subjected to moderate caloric restriction during lactation. This restriction results in the establishment of a healthier phenotype of the

offspring in adulthood, therefore, in the present study, the aim is to determine if myoinositol could play an important role in metabolic programming events during lactation. To study this, two groups of Wistar rats have been used, which have allowed the comparison of a control group with a group supplemented with physiological doses myoinositol during lactation, and in both sexes. Weight and body composition have been studied, as well as protein levels of uncoupling protein 1 (UCP1) and gene expression of *Ucp1* in brown adipose tissue (BAT) by performing a western blot and a real time RT-PCR, respectively, at 7 months of age. These parameters have been analyzed in order to determine if myoinositol during lactation could be involved in the programming of BAT and affect the thermogenic capacity of the animals. The results obtained seem to reveal a sexual dimorphism regarding the effect of supplementation with myoinositol during lactation. Specifically, although no changes in the body weight of the animals are observed, an increase in lean mass is observed, as well as a tendency to a higher expression of *Ucp1* in males supplemented with myoinositol compared to the control group, although without changes in the levels of the UCP1 protein. However, in females supplemented with myoinositol, no changes were detected compared to those in the control group in the determined parameters.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 La obesidad: una epidemia global

La obesidad se define como una enfermedad multifactorial caracterizada por una acumulación de grasa en exceso que puede comportar el desarrollo de toda una serie de patologías que se van complicando con el paso del tiempo si no se aplican las medidas correspondientes. Para determinar si una persona presenta el perfil asociado a esta patología generalmente se suele medir el índice de masa corporal (IMC), que hace referencia a la masa de un individuo por el cuadrado de su talla. De esta forma se considera que la persona presenta sobrepeso si el IMC es igual o superior a  $25 \text{ kg/m}^2$  y obesidad si este resulta ser mayor o igual que  $30 \text{ kg/m}^2$ <sup>1</sup>.

Actualmente existe una gran preocupación puesto que, a medida que se van actualizando los datos de prevalencia de obesidad, se observa un aumento en el número de casos. De hecho, se ha calculado que desde 1975 prácticamente se ha triplicado el número de gente afectada<sup>1</sup>. Además, no se trata de un problema que se dé únicamente en adultos, sino que cada vez se están dando más casos de adolescentes y menores con obesidad. Generalmente esta patología se asocia al desequilibrio energético vinculado al incremento de una dieta rica en alimentos con un elevado contenido calórico, así como por un aumento del sedentarismo<sup>1</sup>. No obstante, existen muchos otros factores que contribuyen al asentamiento del fenotipo obeso, como son la predisposición genética, el ambiente, la falta de información, factores socioculturales, socioeconómicos, biológicos, entre otros<sup>2</sup>.

El hecho de que la obesidad comprometa la vida de gran parte de la población a nivel mundial hace que se encuentren investigaciones en curso constantemente. Gracias a ello, se han ido descubriendo cuales son las consecuencias que acarrea este exceso de peso. Muchas de las comorbilidades de esta patología se ven reflejadas en lo que se conoce como síndrome metabólico, considerado como tal en el supuesto de que se cumplan tres de las siguientes características: circunferencia amplia de cintura, concentraciones anormales de triglicéridos, glucosa en ayunas, hipertensión y colesterol HDL<sup>3</sup>. Para poder tratar esta enfermedad y disminuir el número de sujetos que la padecen, es necesario comprender los distintos mecanismos que están implicados en su desarrollo. Es por este motivo por el cual, durante las últimas dos décadas, se ha estado trabajando para identificar determinantes genéticos de la enfermedad mediante la realización de estudios desde el genoma completo, hasta de genes concretos que parecen estar asociados a la obesidad. Además, dichos estudios no se limitan exclusivamente a elementos de la genética clásica, dado que también se ha visto como la epigenética, que está determinada por una fuerte influencia ambiental, afecta a la susceptibilidad a padecer la enfermedad<sup>4</sup>. Por tanto, es de suma importancia conocer en profundidad todos los factores implicados en el desarrollo de la obesidad para lograr, de esta manera, frenar o controlar el volumen de gente que se ve afectada.

Además, la instauración en el tiempo de un estado nutricional inadecuado y no equilibrado no solo comporta problemas de salud a nivel individual, sino que también afecta a la descendencia del individuo. Se sabe que el estado nutricional no es adecuado

tanto cuando existe una malnutrición, fruto de una ingesta energética más baja que el consumo energético (balance energético negativo), como una sobrealimentación (balance energético positivo)<sup>5,6</sup>. A continuación, a lo largo del trabajo se hará especial énfasis en la etapa de lactancia ya que, junto con la gestación, representa un periodo muy importante en la programación de la futura salud metabólica de la descendencia.

## **1.2 Efecto del ambiente nutricional durante la etapa perinatal sobre la programación metabólica en la edad adulta.**

Actualmente gran parte de la población a nivel mundial dispone, generalmente, de una extensa variedad de alimentos. Aunque debería resultar un aspecto ventajoso, el abusar de la ingesta excesiva y de alimentos con un perfil menos saludable ha propiciado un incremento notable en la prevalencia de obesidad, tal y como se ha comentado previamente. Es tal la magnitud del problema hoy en día que ya se dan casos de obesidad desde la niñez, lo que supone, en cierta manera, que aumente la predisposición de estos niños a convertirse en adultos obesos<sup>7</sup>. Sin embargo, aunque es esencial que se efectúe un control del estado de salud ya desde la infancia, lo ideal sería empezar a trabajar en una regulación durante la gestación, e incluso antes, ya que estos son periodos críticos para la programación metabólica. Dicha programación metabólica hace referencia a los cambios que sufre el organismo tras ser expuesto a determinados estímulos ambientales durante etapas críticas del desarrollo; cambios que podrían predisponer al feto a padecer obesidad u otras complicaciones en un futuro<sup>8</sup>. El creciente número de evidencias obtenidas por la realización de distintos estudios sustenta la idea de que la exposición a un ambiente obesogénico en el útero desempeña un papel crucial en la relación entre la obesidad materna y la prevalencia de obesidad u otras características del síndrome metabólico en la descendencia<sup>8,9</sup>.

Esta relación existente entre el progenitor y el descendiente se ha demostrado en numerosos estudios en los que se observa como la programación metabólica se da sobre todo en etapas tempranas del desarrollo y, por ende, esto determinaría la salud del sujeto en edad adulta<sup>10</sup>. Dicha relación es posible explicarla hoy en día, principalmente, gracias a los cambios epigenéticos. La epigenética consiste en el control de la expresión génica a través de mecanismos no relacionados con la secuencia codificante del ADN. Este control lo ejerce mediante las marcas epigenéticas, que radican en la adición de compuestos químicos al ADN o a las histonas y cuya presencia condiciona la conformación espacial de la cromatina y, en consecuencia, la expresión génica<sup>11</sup>. Los cambios epigenéticos que se dan, inducidos por una dieta inadecuada, provocan alteraciones en la expresión génica que pueden aumentar o disminuir la predisposición de los hijos a padecer obesidad<sup>12</sup>. Es tal la influencia del ambiente, que parece ser que, si se restableciera una dieta normocalórica previa a la reproducción del individuo, podrían revertirse los efectos negativos que ocasionaría la ingesta de una dieta obesogénica sobre la programación metabólica de la descendencia<sup>13</sup>. Además del impacto que tiene el estado nutricional de la madre sobre las marcas epigenéticas, otro mecanismo influyente serían los miARN. Los miARN son moléculas de ARN monocatenario implicadas en la regulación epigenética mediante la alteración de transcritos postranscripcionales y se ha visto que un mal estado nutricional de la madre durante la gestación (por obesidad o malnutrición) podría propiciar alteraciones que

afecten al desarrollo fetal <sup>14,15</sup>. Concretamente, en este estudio del 2017 <sup>15</sup>, se demuestra como la obesidad materna provoca una desregulación de miARNs placentarios relacionados con los parámetros de crecimiento, el peso placentario y el peso al nacer de las crías, detectándose, por tanto, un mayor peso corporal a los 4 y 12 meses de edad.

Además de la epigenética, existen otros mecanismos implicados en la programación. Por ejemplo, parece ser que el estrés oxidativo regularía la expresión génica, ya sea mediante los efectos indirectos de las moléculas oxidadas, o llevando a cabo alteraciones epigenéticas. Otro posible mecanismo sería la influencia del estrés sobre el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, que induciría la liberación de grandes concentraciones de glucocorticoides y esto se asociaría a un mayor riesgo del infante a padecer enfermedades en la etapa adulta. También se vinculan la disfunción placentaria, los procesos inflamatorios, entre otros <sup>16</sup>. En la figura 1 se esquematizan algunos de los principales mecanismos implicados en la programación metabólica de la descendencia en edad adulta.



**Figura 1.** Esquema de algunos de los mecanismos implicados en la programación metabólica de la descendencia en la edad adulta.

Por tanto, existe un gran número de evidencias con respecto a las posibles alteraciones producidas a nivel metabólico desde el periodo pregestacional y gestacional. Sin embargo, tras la gestación, otro de los fenómenos con gran impacto sobre la programación metabólica de la descendencia en edad adulta es la lactancia. Durante esta etapa el estado nutricional de la madre sigue teniendo mucha importancia, puesto que, perturbaciones en este, podrían alterar el suministro de nutrientes vía perinatal y esto afectaría a la programación metabólica de diversos tejidos clave, entre ellos, del tejido adiposo blanco (TAB) en la descendencia. El motivo por el cual se hace especial énfasis en los periodos de gestación y lactancia es porque las células madre de los adipocitos presentes tanto en fetos como en neonatos, debido a su elevada plasticidad, son altamente sensibles a los factores maternos <sup>17</sup>. Por tanto, es probable que, bajo condiciones alimenticias inadecuadas, se vean alterados tanto el desarrollo como la funcionalidad de los adipocitos. Un efecto similar se observa en el tejido adiposo marrón (TAM) ya que cada vez se están obteniendo más evidencias de como el ambiente nutricional podría alterar la deposición del TAM permanentemente, lo que se traduciría en una disminución del gasto energético y, por ende, en una mayor probabilidad de ser obeso en un futuro <sup>18</sup>. Además de estos tejidos, también se ven afectados toda una serie

de órganos, hecho que incrementa todavía más la susceptibilidad del neonato a padecer una enfermedad en la edad adulta <sup>19</sup>. Tras la realización de un amplio abanico de estudios con diferentes modelos animales, se ha podido concluir que otra de las características que más comúnmente presentan los neonatos de madres alimentadas con una dieta rica en grasas es la resistencia a la insulina. El desarrollo de esta condición se produce a causa de un empeoramiento en la morfología y la funcionalidad del páncreas que, debido a la exposición continuada a este ambiente, acaba culminando en una disfunción pancreática <sup>19</sup>.

Es por estas repercusiones negativas, entre otras, por las que resulta indispensable llevar una alimentación óptima a lo largo de la vida y, sobre todo, durante la gestación y la lactancia. Para el mantenimiento de una dieta adecuada se debe tener especial cuidado con la calidad del componente lipídico ingerido, además de otros nutrientes. Esto se debe a que, en función del tipo de ácido graso que predomina en el alimento, se pueden obtener efectos más o menos positivos. Mientras que se ha visto que las grasas insaturadas están relacionadas con un incremento en la proporción de islotes pancreáticos, cuando predominan las saturadas el efecto es el contrario y, por tanto, en este caso se favorecería la predisposición a padecer diabetes <sup>19</sup>. Cabe destacar que la alimentación materna se considera el principal foco en las investigaciones sobre la programación metabólica de las crías, no solo a causa de los efectos negativos que tendría la obesidad de la madre sobre la descendencia, sino que, además, se ha comprobado que el cambio a una dieta saludable revertiría los efectos perjudiciales, de manera que la descendencia podría no verse afectada en un futuro <sup>13</sup>.

### **1.3 Lactancia y compuestos de interés de la leche materna**

La lactancia es considerada como la principal vía de alimentación del recién nacido debido a las numerosas ventajas que presenta. Por este motivo, tanto la OMS como UNICEF, la recomiendan como forma exclusiva de alimentación del infante durante sus primeros seis meses de vida <sup>20</sup>. Los efectos beneficiosos de esta se atribuyen a la leche materna, cuya composición podría verse alterada como resultado de modificaciones en la ingesta de la madre. Si bien es cierto que con una dieta no adecuada por lo general se mantendría, a grandes rasgos, la calidad de la leche, es necesario llevar a cabo una serie de controles durante esta etapa para asegurar un aporte nutricional óptimo al hijo y recurrir a la toma de suplementos o cambios en la dieta en casos en los que se detecte algún tipo de déficit nutricional en el infante <sup>21</sup>.

Aun conociendo los aspectos ventajosos que presenta la leche materna, hay un gran número de personas que optan por la leche de fórmula. Esta se asemeja bastante a la leche materna, ya que continuamente se llevan a cabo estudios para mimetizar al máximo su composición y para determinar aquellos componentes de la leche materna que tengan un efecto positivo a largo plazo y, de esta manera, tratar de incorporarlos a la leche de fórmula para mimetizar dichos efectos y su composición. Sin embargo, debido a la compleja composición de la leche materna, todavía no se han dilucidado muchos de los componentes relacionados con los efectos protectores que presentan los infantes lactantes frente a determinadas patologías como la diabetes, enfermedades infecciosas o la obesidad <sup>22</sup>. Además, otros inconvenientes que impiden reproducir al

100 % la composición de la leche materna son, por un lado, que esta cuenta con ciertos componentes, como células vivas, inmunoglobulinas o compuestos bioactivos, que no pueden ser añadidos a la leche de fórmula porque su viabilidad se vería comprometida y, por otro lado, que algunos de sus componentes todavía no se conocen. Es más, tratando de incluir el mayor número de elementos en la leche de fórmula, cabría la posibilidad de que se potenciaran interacciones negativas entre estos <sup>22</sup>.

### **1.3.1 Composición de la leche materna**

La composición de la leche materna es dinámica, dado que varía en función de determinados factores como la alimentación de las madres o la etapa de la lactancia, y también se aprecian diferencias entre individuos y poblaciones <sup>23</sup>. La primera leche de la lactancia, conocida como calostro, se produce durante los primeros días post parto y destaca por su riqueza en componentes inmunológicos y factores de desarrollo y por una baja concentración de lactosa. Pasados estos días, la concentración de lactosa en leche comienza a incrementar y esta fase es conocida como leche de transición. Finalmente, aproximadamente cinco semanas tras el parto, la composición de la leche materna vuelve a cambiar ligeramente y ésta ya es considerada leche madura <sup>23</sup>.

Sin embargo, aunque se den estas ligeras variaciones, hay una serie de elementos que, ya sea en mayor o menor proporción, siempre están presentes en la leche materna.

En primer lugar, destacan los macronutrientes, como son las grasas, las proteínas y los hidratos de carbono. Los lípidos constituyen la principal fuente de energía y, dentro de esta fracción, destaca el alto contenido en triglicéridos. Estos tienen gran importancia ya que estudios previos muestran como este alto porcentaje de lípidos, en el que destacan los ácidos oleico y palmítico, tiene un efecto protector contra la obesidad en la edad adulta <sup>23,24</sup>. Con respecto a las proteínas, la leche materna contiene cerca de cuatrocientas diferentes y estas desempeñan desde funciones nutritivas hasta antimicrobianas. Algunas de las proteínas más destacables serían la caseína, la  $\alpha$ -lactalbúmina y la inmunoglobulina A. Por último, dentro del grupo de los carbohidratos y, como se ha comentado previamente, destaca la lactosa. Este disacárido se asocia al crecimiento y ganancia de peso del infante debido a que, cuando está presente en elevadas proporciones, promueve un aumento en los depósitos de glucógeno y grasas <sup>24,25</sup>.

Además de los macronutrientes, los micronutrientes también son necesarios para el correcto desarrollo del niño. En función de la dieta de la madre se pueden dar deficiencias en algunos de estos, como en determinadas vitaminas, por lo que podría verse afectada la salud del hijo. Por este motivo, para asegurar que se cubran todas sus necesidades nutricionales, puede ser necesario que la madre tome algún tipo de suplemento en caso de déficit de algún micronutriente <sup>23,24</sup>.

Otro aspecto a realzar de la leche materna es el elevado número de factores de crecimiento que presenta, cuya presencia tiene un fuerte impacto sobre el tracto intestinal (por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico), el sistema nervioso (factores de crecimiento neuronal), la vasculatura (factor de crecimiento endotelial vascular) y el sistema endocrino <sup>23</sup>. Además, ésta cuenta con toda una serie de hormonas entre las que destacarían la leptina, como hormona implicada en el control del balance

energético y la regulación del apetito, y la adiponectina como hormona supresora de la inflamación y reguladora del metabolismo del infante. No obstante, además de éstas, la leche materna presenta otras hormonas que contribuyen a esta regulación, como son la resistina y la grelina <sup>23</sup>.

También se ha visto que la alimentación con leche materna tiene un efecto protector contra la infección y la inflamación, y esto se debe principalmente a la gran cantidad de factores inmunológicos que contiene. Algunos de estos son los macrófagos, linfocitos, citoquinas (como el factor de crecimiento transformante  $\beta$ ), entre otros. Un papel similar lo tienen los oligosacáridos de la leche humana (HMO) que, aunque no son nutritivos, estimulan el crecimiento de organismos beneficiosos. Por tanto, los HMO, juntamente con la microbiota presente en la leche, instauran la microbiota intestinal del infante, protegiéndolo de la colonización por bacterias patógenas <sup>23,24</sup>.

Una fracción de los constituyentes de la leche materna, como las citoquinas, las hormonas, los factores de crecimiento y las inmunoglobulinas, son compuestos bioactivos. Estos se caracterizan por estar implicados en determinados procesos que pueden promover una mejora de la salud del individuo. Por tanto, podrían jugar un papel importante en el desarrollo del niño, de manera que sería interesante la investigación de estos elementos para su posible aplicación en la práctica clínica <sup>23,26</sup>. Un ejemplo de compuesto bioactivo presente en la leche materna podría ser el mioinositol.

### **1.3.1.1 Mioinositol**

Los inositoles son una familia de compuestos orgánicos formada por nueve estereoisómeros diferentes, siendo el mioinositol el más abundante. El mioinositol es el precursor de un segundo mensajero, denominado inositol trifosfato, implicado en la regulación de hormonas como la hormona folículo estimulante, la hormona estimulante de la tiroides y la insulina <sup>27</sup>. De hecho, figuran una amplia variedad de estudios que ponen de manifiesto la eficacia del uso del mioinositol para el tratamiento del síndrome de ovario poliquístico, así como para tratar la resistencia a la insulina o prevenir posibles complicaciones de la diabetes <sup>28,29,30</sup>. Además de estos efectos, también es necesario para el crecimiento y la supervivencia celular, la osteogénesis y el desarrollo de los nervios periféricos <sup>30</sup>. Sin embargo, como este trabajo se focaliza en el impacto del mioinositol sobre la masa corporal de los descendientes en la edad adulta, se destacan sus efectos a nivel metabólico.

El motivo que condujo a la realización de este estudio fue descubrir en ratas que, si durante la lactancia se somete a la madre a una restricción calórica moderada, cambia la composición de la leche, de manera que se observa un incremento en la concentración de mioinositol, además de cambios en otros compuestos, con respecto a la leche de una madre a la que no se le ha sometido a tal restricción <sup>31</sup>. Dicho hallazgo podría relacionarse con el efecto beneficioso que se ha descrito que tiene dicha restricción en ratas durante la lactancia sobre la descendencia, pudiendo concluir que el mioinositol podría estar involucrado en la programación metabólica de un estado saludable en la descendencia en la edad adulta <sup>31</sup>. Además, se han obtenido evidencias de que la suplementación diaria con mioinositol podría contribuir a la disminución del

riesgo cardiovascular en aquellas personas con síndrome metabólico <sup>30</sup>. Aunque en la mayoría de estudios en los que se mira el efecto de este compuesto trabajan con sujetos con un estado hormonal particular, como es el embarazo, la menopausia o el síndrome de ovarios poliquísticos <sup>30</sup>, cabe decir que también se han observado efectos positivos en experimentos realizados con animales sanos. Por ejemplo, en un estudio realizado con ratones sanos, se puede apreciar como el mioinositol mimetiza el efecto de la insulina, ya que, tras una sobrecarga de glucosa, la suplementación vía oral con mioinositol estimularía la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática del músculo esquelético de estos animales, propiciando, de esta manera, una disminución de los niveles de glucosa plasmáticos <sup>32</sup>. Asimismo, en otros estudios parece ponerse de manifiesto un efecto lipotrópico de este elemento. Se ha propuesto que estimula la metabolización de los lípidos en el hígado porque, en investigaciones previas en las que se les ha inducido a un grupo de animales lactantes una privación de dicho compuesto, se detectó una liberación mucho más lenta de las lipoproteínas del hígado al suero con respecto al grupo control. Esto resulta perjudicial dado que supone la acumulación de gotículas lipídicas a nivel hepático, las cuales, a la larga, podrían conducir a la aparición de hígado graso <sup>33</sup>.

El gran número de beneficios asociados a este compuesto hace pensar que podría tratarse de uno de los componentes que, al ser suministrados durante la lactancia, contribuyen al mantenimiento de un fenotipo saludable de la descendencia en la edad adulta.

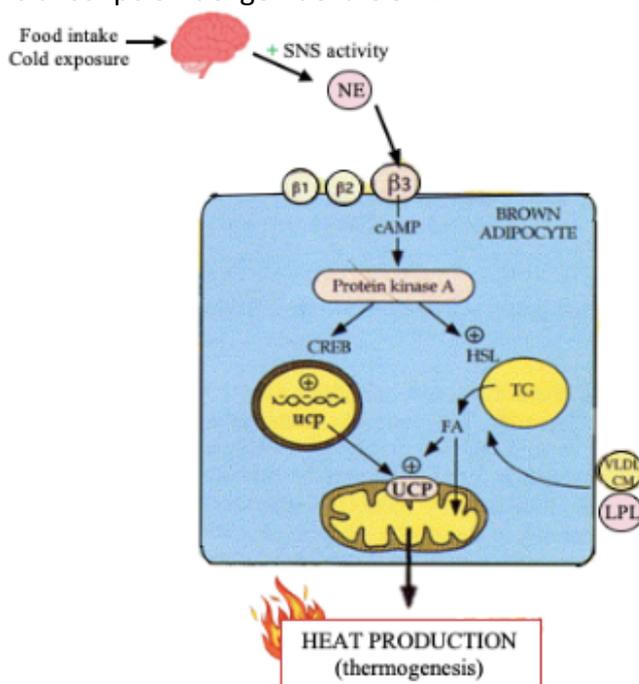
#### **1.4 El tejido adiposo marrón y la termogénesis**

Otra alternativa interesante que se plantea como diana para el tratamiento de la obesidad es el tejido adiposo marrón. Además, como se ha comentado previamente, el ambiente nutricional podría alterar la disponibilidad de este tejido y esto podría estar relacionado con el control del peso del individuo. Por este motivo, en el presente estudio resulta interesante analizar si el mioinositol podría contribuir a su programación metabólica y de qué forma.

Como sabemos, existen dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón (TAM). Estos tienen funciones contrapuestas ya que, mientras el TAB se encarga del almacenamiento del exceso de energía en forma de triglicéridos, la función del TAM es la disipación de energía en forma de calor <sup>34</sup>. El TAM se encuentra en mayor proporción en recién nacidos y en mamíferos pequeños, e inicialmente se pensaba que en adultos ya no estaba presente. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que en adultos también está presente, aunque en baja cantidad, y este se ubica generalmente en las regiones cervical, paravertebral, supraclavicular, axilar, mediastínica y abdominal superior <sup>34</sup>. Esta distribución estratégica tiene la función de calentar la sangre que va a ser dispensada a los distintos órganos <sup>34</sup>. Se sabe que, en respuesta a estímulos como el frío o el estado hipercalórico, se produce la termogénesis adaptativa, que hace referencia a la generación de calor por parte del cuerpo al recibir dichos estímulos <sup>34</sup>.

El proceso de termogénesis es posible gracias al elevado número de mitocondrias presentes en el TAM y a las características de este tejido. Esto se debe a que en éstas es donde tiene lugar la fosforilación oxidativa, proceso que culmina con la síntesis del ATP, necesario para cubrir nuestros requerimientos energéticos. Sin embargo, bajo los estímulos comentados previamente, y al cambiar las necesidades del individuo, se prioriza el gasto energético por encima de la síntesis. De esta manera, gracias a la acción de una proteína denominada proteína de desacoplamiento 1 (UCP1) situada en la membrana mitocondrial interna, se permite el paso de protones, lo que culmina con la disipación de energía en forma de calor en lugar de en la síntesis de ATP <sup>34,35</sup>. La UCP1 está regulada principalmente por los ácidos grasos y las purinas. Esto se ha podido observar en estudios que ponen de manifiesto una nula actividad de esta proteína en ausencia de ácidos grasos, así como su inhibición en presencia de purinas, causada por la unión de estas a la cara citosólica de la UCP1 <sup>35</sup>. No obstante, concentraciones elevadas de ácidos grasos de cadena larga son capaces de superar la inhibición de la UCP1 inducida por los nucleótidos de purina.

El centro de control de la actividad del TAM es el núcleo hipotalámico ventromedial. Esta área del cerebro, frente a estímulos externos, se encarga de la transmisión de la señal a través del sistema nervioso simpático hacia los adipocitos marrones. El encargado de dicha transmisión de la señal es la noradrenalina, que, al interactuar con los receptores  $\beta$  adrenérgicos situados en la superficie de los adipocitos marrones, cataliza la síntesis de AMP cíclico (AMPc) a través de la activación de la adenilil ciclasa. Una vez sintetizado el AMPc, este activa a la proteína quinasa A (PKA) que, a su vez, activa la lipasa de triglicéridos, dando lugar a la escisión de los ácidos grasos de los triglicéridos. Los ácidos grasos libres resultantes inducen la actividad de la UCP1, de manera que la proteína inicia la combustión de estos <sup>35,36</sup> y da lugar a una mayor producción de calor mediante el mecanismo de reentrada de protones a la matriz mitocondrial. Por otro lado, los ácidos grasos libres obtenidos también inducen la activación de la proteína de unión a elementos de respuesta de AMPc (CREB), la cual tiene la función de estimular la transcripción del gen de la UCP 1 <sup>37</sup>.



**Figura 2.** Representación del mecanismo de termogénesis adaptativa en el tejido adiposo marrón regulado por el núcleo hipotalámico ventromedial. Se indica como la noradrenalina (NE) tras la recepción de estímulos externos, interactúa con los receptores  $\beta$  adrenérgicos y dicho proceso culmina con la activación de la proteína quinasa A (PKA). La PKA a su vez activa la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la proteína de unión a elementos de respuesta de AMPc (CREB), lo que culminará con la estimulación de la transcripción y la actividad de la proteína desacoplante 1 (UCP1). Imagen modificada de A et al., 1998 <sup>37</sup>.

El uso de lípidos por el TAM para su combustión hace que sea considerado como protector contra la obesidad. Por tanto, actualmente se trabaja en la búsqueda de alternativas para la activación de la función de este o para la obtención de adipocitos marrones a partir de los blancos, proceso conocido como marronización <sup>38</sup>. Por otra parte, también resulta de interés detallar determinadas condiciones durante etapas críticas del desarrollo, o si la ingesta de determinados compuestos presentes en la leche materna puede contribuir a una mejora en la capacidad termogénica en edad adulta.

## **2. OBJETIVO Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **2.1 Objetivo**

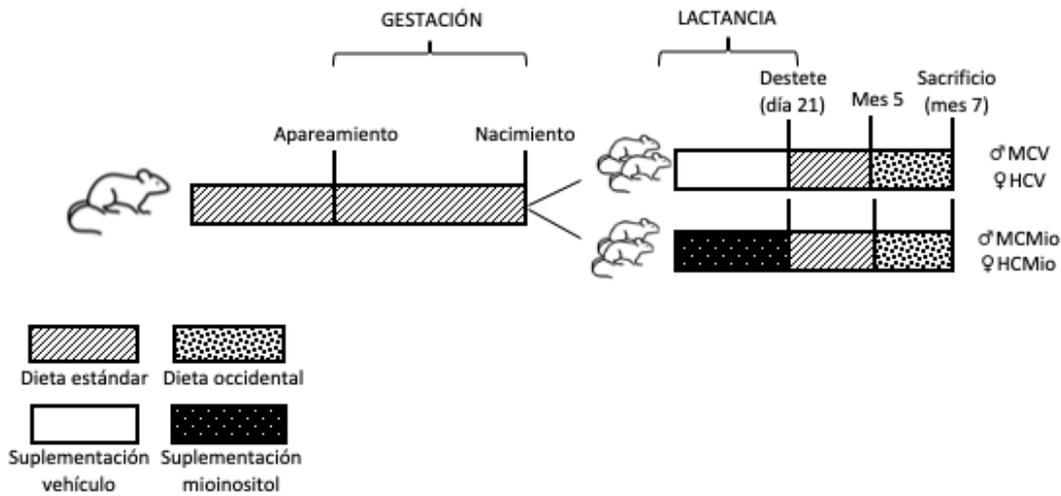
En la leche materna hay una serie de componentes cuyo impacto es positivo sobre la salud futura del individuo lactante y que no están presentes en la leche de fórmula, o lo están en cantidades más bajas. El objetivo de este trabajo es analizar el efecto de la suplementación de las crías con uno de estos componentes, como es el mioinositol, durante la lactancia en su programación de la salud metabólica en edad adulta, ya que se ha visto que éste se encuentra en mayor concentración en la leche de madres sometidas a una restricción calórica moderada durante la lactancia, condición que, a su vez, se asocia al establecimiento de un fenotipo más saludable de la descendencia en edad adulta. En concreto, se va a estudiar la capacidad termogénica de los animales mediante la medición de la expresión de Ucp1 y los niveles proteicos de UCP1 en TAM, así como el peso y la composición corporal de éstos.

### **2.2 Diseño experimental**

El estudio se llevó a cabo por el grupo de investigación del Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología de la Universidad de las Islas Baleares (grupo de Nutrigenómica y Obesidad). Para éste se utilizaron ratas *Wistar*, que fueron divididas en diferentes grupos en función del tratamiento. Las ratas hembra que se iban a aparear con machos fueron alimentadas con una dieta estándar. Tras el nacimiento se normalizó el número de crías resultantes de las diferentes camadas a 10 y, en caso de que fuera posible, se mantuvieron 5 hembras y 5 machos. Para el periodo de lactancia se dividieron las crías resultantes en dos grupos. Ambos se diferenciaban únicamente en el tratamiento recibido durante la lactancia, puesto que el grupo experimental fue suplementado con dosis fisiológicas de mioinositol en este periodo, mientras que el grupo control no. El día 21 de vida de las crías se produjo el destete y, a partir de este punto, todas ellas fueron estabuladas y alimentadas con dieta estándar hasta los 5 meses de vida, momento en que se inició el cambio a una dieta occidental (*western*), rica en grasa y sacarosa, hasta los 7 meses (*Figura 3*). Finalmente, a la edad de 7 meses, los animales se sacrificaron mediante decapitación con guillotina para la obtención y el almacenamiento de los tejidos a -80°C.

Los grupos resultantes que conforman el presente experimento son los siguientes. Por un lado, hay un grupo control, constituido por 8 machos (MCV) y 8 hembras (HCV). Por otro lado, el grupo mioinositol está formado por 6 machos (MCMio) y 7 hembras (HCMio). Cabe añadir que este experimento forma parte de un estudio más amplio en

el cual, además del grupo mioinositol, había otros dos grupos; uno que permitía apreciar el efecto de una restricción calórica durante la gestación y otro la combinación de la restricción calórica durante la gestación con la suplementación con mioinositol.



**Figura 3.** Esquema del diseño experimental realizado para el estudio del efecto de la suplementación con mioinositol durante la lactancia sobre la programación metabólica de la descendencia en la edad adulta. Se muestran los 4 grupos experimentales que conforman el experimento. Durante la lactancia las madres seguían siendo alimentadas con una dieta estándar.

La dieta estándar está formada por pienso (pienso A04, Panlab) con un perfil nutricional de un 73 % de hidratos de carbono, un 8 % de grasas y un 19 % de proteínas y un aporte energético de 3,4 Kcal/g. Por otro lado, la dieta occidental (*western* D12079B, Research Diets) consiste en un pienso con elevada proporción de grasa y sacarosa que aporta 4,7 Kcal/g y se compone de un 43 % de carbohidratos, un 41 % de grasa y un 17 % de proteínas. La composición de las dos dietas utilizadas para el experimento varía ya que con la dieta estándar resultaría más complicado ver los efectos beneficiosos que se esperaba obtener al suplementar con mioinositol durante la lactancia. En cambio, si se les proporciona a las ratas una dieta occidental, ésta les resulta más apetecible y ello propicia un incremento en la ingesta y, de esta manera, se pueden apreciar mejor los posibles cambios asociados al tratamiento.

El presente estudio se llevó a cabo a partir de muestras de TAM cedidas por el Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología. Durante el periodo correspondiente a la realización del TFG, se realizó el análisis de este tejido para determinar si la suplementación con mioinositol durante la lactancia podría afectar a su programación. Dicho análisis consistió en la determinación de la expresión génica de *Ucp1*, mediante la ejecución de una RT-qPCR, y de la cantidad de proteína de UCP1, inferida por *western blot*, en el TAM. Adicionalmente, se analizó el peso y porcentaje de grasa de los animales, así como el peso del TAM y su contenido proteico. Sin embargo, cabe añadir que no participé directamente en la obtención de los datos de los pesos de los animales y los tejidos, pero sí en la obtención de los mismos en un experimento diferente realizado por el mismo grupo de investigación.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Experimentación animal**

El modelo de uso de animales establecido para la parte experimental del estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de las Islas Baleares (Ref. 3513 (26/03/2012)) y sigue las recomendaciones generales para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

#### **3.2 Determinación de la expresión génica de *Ucp1* en TAM mediante RT-PCR a tiempo real**

La RT-PCR a tiempo real es una técnica que permite la detección y medición de la expresión de un gen de interés. Ésta consiste en una combinación de tres pasos: la conversión del ARN a ADNc mediante la acción de la transcriptasa reversa (RT), la amplificación del ADNc mediante PCR y la cuantificación de la amplificación a tiempo real<sup>39</sup>.

##### **3.2.1 Extracción de ARN**

Para la extracción del ARN se obtuvo una porción de aproximadamente 0,035- 0,04 g del TAM de cada animal. Se llevó a cabo una extracción de ARN en columnas a partir del kit comercial E.Z.N.A.<sup>®</sup> Total RNA Kit I (Omega Bio-tek), que contiene todos los reactivos necesarios para el proceso. El primer paso consistió en la homogenización del tejido pesado (homogeneizador VDI 12, VWR) en 700  $\mu$ L de TRK Lysis Buffer en hielo. Después, tras llevar a cabo una centrifugación a 13.000 x g durante 5 min a 4 °C, el sobrenadante se recuperó y se mezcló con 700  $\mu$ L de etanol 70 %. La mezcla resultante fue transferida a una columna HiBind ARN spin y se realizó una centrifugación a 10.000 x g durante 1 min a temperatura ambiente. Tras descartar el eluyente, se pipetearon 350  $\mu$ L de RNA Wash Buffer I y se centrifugó a 10.000 x g durante 1 min a temperatura ambiente. El siguiente paso consistió en la preparación de la DNasa, ya que después se necesitaba. Para la preparación de la DNasa de cada muestra se requerían 36,75  $\mu$ L de DNase I Digestion Buffer y 0,75  $\mu$ L de RNase-free DNase. Tras la centrifugación se pipetearon 35  $\mu$ L de DNasa sobre la superficie de la membrana y ésta se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Pasados los 15 min se pipetearon 400  $\mu$ L RNA Wash Buffer I para realizar un lavado de las columnas y se centrifugó a 10.000 x g durante 1 min a temperatura ambiente. Tras descartar el eluyente obtenido, se pipetearon 500  $\mu$ L de RNA Wash Buffer II (para hacer un segundo lavado) y se centrifugó a 10.000 x g durante 1 min a temperatura ambiente. Después se hizo el tercer y último lavado con 350  $\mu$ L de RNA Wash Buffer II a 10.000 x g durante 1 min y temperatura ambiente. Finalmente, las columnas se centrifugaron con los colectores vacíos a 13.000 x g durante 2 min a temperatura ambiente para terminar de purificar. Tras la centrifugación se colocó la columna en un tubo nuevo y se pipetearon 30  $\mu$ L de agua libre de RNasas sobre la superficie de la membrana y se hizo una última centrifugación a 10.000 x g durante 2 min a temperatura ambiente con el objetivo de obtener el ARN ya purificado.

### 3.2.2 Cuantificación del ARN

Una vez completado el proceso de extracción del ARN se procedió a su cuantificación mediante la lectura de las muestras con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 a 260 nm. Para llevar a cabo la lectura se insertaron 2  $\mu\text{L}$  de la muestra en el espectrofotómetro para la determinación de la concentración de ARN y del ratio 260/280. Dicho ratio proporciona información sobre la pureza de la muestra, considerándose pura si la muestra tiene un ratio próximo a 2 o, por el contrario, impura o contaminada por ADN si el ratio es superior a 2.

### 3.2.3 Retrotranscripción

La retrotranscripción se llevó a cabo para poder obtener ADNc a partir del ARN aislado de las muestras. Sin embargo, antes del inicio de la retrotranscripción fue necesario realizar una corrección de las muestras de ARN, es decir, se igualó la concentración de todas las muestras a aproximadamente 50  $\eta\text{g} / \mu\text{L}$  realizando diluciones para que, al hacer la PCR, las diferencias en la expresión génica de *Ucp1* fueran causadas, exclusivamente, por una mayor o menor expresión y no por variaciones en la concentración de ARN.

Una vez se igualaron las concentraciones de las muestras a 250  $\eta\text{g}$  (5  $\mu\text{L}$  de dilución de 50 $\eta\text{g} / \mu\text{L}$ ), se pipetearon 5  $\mu\text{L}$  de las diluciones y se desnaturalizaron las muestras en un termociclador (Thermo Cycler 2720, Applied Biosystems) a 65  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Tras el proceso de desnaturalización se pipetearon 7,5  $\mu\text{L}$  de la mix por cada muestra. Ésta se compone de 2,5  $\mu\text{L}$  de Buffer 5x, 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs 2,5 mM, 0,5  $\mu\text{L}$  de hexámeros, 0,5  $\mu\text{L}$  de inhibidores de RNAsas, 0,5  $\mu\text{L}$  de enzima RT y 1,5  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas. Las condiciones de la retrotranscripción fueron: 10 min a 25  $^{\circ}\text{C}$  (activación enzima y anillamiento), 50 min a 37  $^{\circ}\text{C}$  (polimerización), 15 min a 70 $^{\circ}\text{C}$  (desactivación enzima) y finalmente se mantuvieron a 4  $^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.4 PCR a tiempo real

Antes iniciar la PCR fue necesario realizar una dilución 1:10 del producto de la retrotranscripción a fin de evitar una rápida saturación. De la dilución resultante se utilizaron 2  $\mu\text{L}$  por muestra y éstos se mezclaron con 9  $\mu\text{L}$  de la mix de la PCR, cuya composición es la siguiente: 5  $\mu\text{L}$  de Power Sybr Green, 0,45  $\mu\text{L}$  de cada cebador (Forward y Reverse, 10  $\mu\text{M}$ ) y 3,1  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas. La PCR se produjo en un termociclador (StepOnePlus™ Real-Time PCR System) y las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 10 min a 95  $^{\circ}\text{C}$  para desnaturalizar, 40 ciclos de 15 s a 95  $^{\circ}\text{C}$  (para la desnaturalización) y 1 min a 60  $^{\circ}\text{C}$  (para permitir el alineamiento y la elongación) y, finalmente, se llevó a cabo una curva de desnaturalización para comprobar la pureza de los productos (15 s a 95  $^{\circ}\text{C}$ , 1 min a 60  $^{\circ}\text{C}$  y 15 s a 95  $^{\circ}\text{C}$ ).

Cabe destacar que, aunque el gen de interés sea el *Ucp1*, además de determinar su expresión se estudió la del gen *GDI* (*housekeeping*), gen necesario para la normalización de los resultados obtenidos de la expresión de *Ucp1*.

### **3.2.5 Análisis de los resultados**

Durante el proceso de la PCR, a medida que se va sintetizando el ADN, se va intercalando el Sybr Green que, a su vez, emite fluorescencia, lo que permite la monitorización del proceso. Por tanto, la fluorescencia refleja la cantidad de ADN presente en cada ciclo de amplificación. Esto hizo posible la determinación del ciclo en el que el aumento de fluorescencia empezó a ser exponencial. Éste recibe el nombre de ciclo umbral (*Cycle threshold*) y tiene un valor inversamente proporcional a la cantidad de ADN. El análisis de los resultados se realizó con el Software de StepOnePlus™ Real-Time PCR System (StepOne v 2.2.2). A partir de los resultados proporcionados por el software se calculó el porcentaje de expresión del gen *Ucp1* para los distintos grupos respecto al grupo de machos vehículo (100 %), lo que hizo posible que se pudieran realizar comparaciones entre sexos.

### **3.3 Determinación de los niveles de la proteína de desacoplamiento 1 (UCP1) en TAM mediante western blot**

El *western blot* es una técnica analítica semicuantitativa cuya función es permitir la determinación de proteínas de interés de entre todas las presentes en una muestra de estudio. Para ello, se distribuyeron las muestras entre tres geles, siendo uno de ellos un gel de referencia. El gel de referencia contiene muestras de los otros dos geles y, al estar repetida una muestra en dos geles, esto permite calcular el factor de corrección, necesario para poder comparar los resultados obtenidos entre ambos sexos. Se realizó una electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), que es un compuesto que confiere carga negativa para asegurar que la separación de las proteínas se lleve a cabo únicamente en función del peso molecular <sup>40</sup>. Tras la electroforesis se llevó a cabo la transferencia de las proteínas de los geles a membranas de nitrocelulosa, y, en éstas, se produjo la detección de la UCP1 gracias a anticuerpos específicos para la proteína. Finalmente, se procedió al escaneo y la cuantificación de las señales obtenidas en los distintos geles.

#### **3.3.1 Extracción de proteínas de la muestra**

A partir de las muestras de TAM de los animales se obtuvo una fracción de tejido comprendida entre 0,1 y 0,15 g. Cada una de éstas se homogeneizaron (homogeneizador VDI 12, VWR) en una dilución 1:5 en reactivo RIPA al cual se añadieron inhibidores de proteasas y fosfatasa (Thermo Fisher, Rockford, IL, USA) a fin de evitar la degradación proteica durante la homogeneización y el aislamiento. Tras la homogeneización, se realizó una centrifugación a 7.500 x g durante 2 min y a 4 °C y,

seguidamente, se recuperó el sobrenadante, en el que se encontraban las proteínas, para proceder a su análisis.

### 3.3.2 Cuantificación de la proteína total

La cuantificación del contenido proteico total se realizó mediante el método de ácido bicinconínico (BCA) <sup>41</sup>. Para poder cuantificar las proteínas de la muestra se hizo un patrón de albúmina bovina (BSA) por triplicado y con concentraciones conocidas, comprendidas entre 0 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BSA 0,1 %. Se hizo tanto una dilución 1:5 como una 1:10 (con diluyente RIPA) para conocer cual entraba mejor dentro del patrón. Después se pipetearon 25  $\mu\text{L}$  de patrón o muestra en pocillos de una placa de ELISA y se añadió a cada uno de los pocillos 200  $\mu\text{L}$  del *working reagent*, que consiste en una mezcla de reactivos que se incluyen en el kit de BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit, Ref. 23225, Thermo Fisher Scientific) y éstos reaccionan con la proteína de la muestra. Una vez pipeteados ambos componentes, se agitó la placa, se incubó 30 min a 37 °C y, finalmente, se leyó a 562 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA. Los resultados de la lectura permitieron elaborar una recta patrón, a partir de la cual se obtuvo un gráfico de dispersión y una función que se usó para realizar los cálculos pertinentes y poder determinar los  $\mu\text{g}$  de proteína por mL de cada dilución a partir de sus valores de densidad óptica. Cuando ya se tuvo la concentración en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se multiplicó el valor obtenido por las diluciones que se hicieron (1/5 y 1/10) y de esta manera ya se podían conocer los  $\mu\text{g}$  de proteína por  $\mu\text{L}$  de la muestra inicial. Estos cálculos permitieron determinar el volumen necesario que se debía cargar de cada muestra para poder igualar todas a una misma concentración (10  $\mu\text{g}$ ) para ejecutar el *western blot*. No obstante, se vio que el volumen que se tendría que coger de la muestra inicial era demasiado pequeño, lo que generaría un amplio rango de error. Por este motivo, se decidió cargar a partir de la dilución 1/5 directamente para que se tratara de un volumen mayor y se pudiera minimizar el error. Por tanto, se volvió a cuantificar la concentración de las diluciones 1/5 originales de la misma forma que en la primera cuantificación y, a partir de estos datos, se hicieron los cálculos correspondientes para poder cargar la misma concentración de cada una de las muestras a la hora de realizar el *western blot*. El motivo por el que se pretende igualar la concentración de la proteína que se quiere cargar es porque, de esta manera, se sabe que las posibles diferencias que se observen en el *western blot* serán debidas a cambios en la concentración de proteína de la muestra y no a cambios en la cantidad que se ha cargado.

### 3.3.3 Preparación de las muestras para cargarlas en el gel

Conocidas las concentraciones de proteína en cada muestra, se calcularon los  $\mu\text{L}$  necesarios de cada muestra para cargar 10 $\mu\text{g}$  de cada una. A estas alícuotas además se les añadió el tampón de carga (aporta densidad a la muestra, permitiendo que migre en el gel, y también se usa para poder ver el frente, ya que proporciona color), así como 2- $\beta$ -mercaptoetanol (para la desnaturalización de las proteínas) y se hirvieron para desnaturalizarlas y que pudieran difundir a través del gel de poliacrilamida.

Cabe decir que, a causa de la pandemia, los pasos posteriores no se pudieron llevar a cabo, de manera que no realicé el *western blot*. Sin embargo, posteriormente uno de los integrantes del grupo de investigación con el que realicé este trabajo llevó a cabo el *western blot* y me cedió los datos para poder analizarlos. A continuación, se comentan brevemente el resto de pasos a seguir.

### **3.3.4 Electroforesis, electrotransferencia, inmunodetección y escaneado de membranas.**

Partiendo de las alícuotas de 10 µg preparadas previamente, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). El SDS es un detergente con carga negativa que se une a las proteínas de la muestra para proporcionarles a todas esta carga y evitar, de esta manera, que las cargas individuales de las proteínas interfieran en la migración por el gel. Por otro lado, la acrilamida, bajo la acción de un campo eléctrico, permite la separación de las proteínas en función del peso molecular. Al finalizar la electroforesis, se llevó a cabo la electrotransferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa. Cuando la transferencia se completó se hizo el bloqueo de la membrana para impedir que se produjeran uniones electrostáticas que no fueran de interés al añadir el anticuerpo primario. Una vez realizado el bloqueo, la membrana se incubó con anticuerpos policlonales primarios de conejo anti-UCP1 para la detección específica de la UCP 1 (proteína de interés) y, tras un lavado, se añadieron los anticuerpos policlonales secundarios de cabra anti-IgG de conejo y se realizó una incubación para permitir la unión de los anticuerpos secundarios a los primarios. Tras la eliminación del anticuerpo secundario de la membrana, se llevó a cabo el mismo procedimiento para la detección de la  $\beta$ -ACTINA (housekeeping), pero, en este caso, con anticuerpos anti- $\beta$ -ACTINA. El anticuerpo secundario presenta de manera conjugada un fluoróforo que le confiere fluorescencia y, tras su unión específica a los anticuerpos primario, permite la detección de la proteína de interés. Finalmente, se llevó a cabo el escaneado de la membrana, lo que permitió que se pudiera determinar de manera semicuantitativa la cantidad de proteína a partir de la fluorescencia emitida por el anticuerpo secundario. De esta manera se pudo inferir de forma semicuantitativa el valor estimado de concentración de las dos proteínas (UCP 1 y  $\beta$ -ACTINA) en cada muestra a partir de la intensidad de la banda. Al tratarse de una técnica semicuantitativa, todos estos valores fueron recalculados respecto al valor de la media de los machos vehículo.

### **3.4 Análisis estadístico**

Se verificó la existencia de posibles valores atípicos antes de realizar el análisis estadístico de los datos. Para ello, se realizaron diagramas de caja de todos los datos para detectar los valores atípicos y, en caso de que hubiera alguno, eliminarlo. Respecto a los test estadísticos, éstos se realizaron con el Software RStudio (R Core Team). En primer lugar, se comprobó la normalidad y varianza de los datos y, en caso de que no siguieran una distribución normal, se hizo una transformación logarítmica de éstos. Después se realizó un ANOVA de dos vías para poder inferir si se daba un efecto sexo,

un efecto grupo, o un efecto interactivo entre tratamiento y sexo. Además, también se hizo la prueba U de Mann-Whitney, en lugar de la T-test, porque el número de muestras era menor a 10. La prueba U de Mann-Whitney permite hacer comparaciones por parejas dentro de un mismo grupo o entre grupos. Por otro lado, también se realizaron correlaciones de Pearson, para observar si existía una relación entre la masa magra y grasa y el TAM.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Peso corporal, grasa corporal y peso y proporción de proteínas del tejido adiposo marrón

En la Tabla 1 se recopilan los datos de la composición corporal de las crías a los 7 meses de edad. Como se ha comentado previamente, los datos han sido cedidos por miembros del grupo de investigación del Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología.

Si se analizan los datos de la tabla, empezando por el peso y la grasa corporal, no se aprecian diferencias entre grupos por efecto del mioinositol, pero si que hay un efecto significativo del sexo tanto en los controles como en los grupos tratados con mioinositol ( $p < 0,05$ , ANOVA de dos vías). En concreto, en ambas situaciones el peso de los machos es significativamente mayor que el de las hembras ( $p < 0,05$ , test U de Mann Whitney). Dicha diferencia entre sexos también se observa en el peso del TAM, ( $p < 0,05$ , ANOVA de dos vías), así como una significancia al comparar el peso entre sexos en ambas condiciones ( $p < 0,05$ , test U de Mann Whitney). No obstante, los valores entre grupos son muy similares, de manera que no se obtienen diferencias en función del tratamiento). En los datos obtenidos de la masa magra, también hay un efecto interactivo entre sexo y mioinositol ( $p < 0,05$ , ANOVA de dos vías). En concreto, en este caso se ha encontrado una diferencia estadísticamente significativa entre sexos en ambas condiciones, así como entre grupos pero solo dentro del sexo masculino, experimentándose un aumento del grupo mioinositol respecto al grupo control ( $p < 0,05$ , test U de Mann-Whitney). Finalmente, se ve como al calcular el porcentaje de masa magra y grasa no se aprecian diferencias notables ni por efecto del sexo, ni por efecto del tratamiento.

	Machos		Hembras		ANOVA
	Vehículo	Mioinositol	Vehículo	Mioinositol	
<b>Peso animal (g)</b>	564 ± 17	596 ± 10	307 ± 5#	306 ± 9#	S
<b>Peso TAM (g)</b>	1,022 ± 0,055	1,193 ± 0,151	0,682 ± 0,029#	0,679 ± 0,082#	S
<b>Masa grasa (g)</b>	141 ± 8	134 ± 10	69 ± 4#	70 ± 8#	S
<b>Masa magra (g)</b>	407 ± 9	446 ± 10*	229 ± 6#	229 ± 4#	S*M
<b>Masa grasa (%)</b>	25 ± 1	23 ± 2	23 ± 1	23 ± 2	-
<b>Masa magra (%)</b>	72 ± 1	75 ± 2	75 ± 1	75 ± 2	-

**Tabla 1.** Peso corporal, del tejido adiposo marrón (TAM), de la masa grasa y de la masa magra, así como los porcentajes de masa magra y grasa de las crías vehículo y mioinositol a los 7 meses de edad. Se presentan las medias ± SEM. Estadística: ANOVA de dos vías ( $p < 0,05$ ), S: efecto sexo,

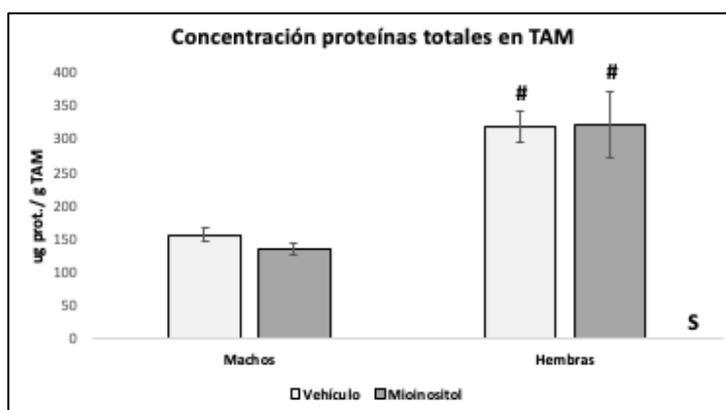
S\*M: efecto interacción sexo y mioinositol; #: hembra vs. macho (ambas condiciones), \*: Mioinositol vs. vehículo (mismo sexo), ( $p < 0,05$ , test U de Mann-Whitney).

También se ha analizado si existe una correlación entre la masa magra y la masa grasa con el peso del TAM. Para ello se han realizado correlaciones de Pearson (tabla 2) obteniéndose significancia únicamente entre el peso del TAM y la masa grasa en hembras ( $p < 0,05$ , correlación de Pearson positiva).

	Correlación	Factor de correlación	Significancia
Peso TAM y masa grasa	Hembras	0,62	0,024
	Machos	-0,148	0,63
Peso TAM y masa magra	Hembras	-0,081	0,792
	Machos	0,454	0,119

**Tabla 2.** Correlaciones de Pearson entre diferentes variables. Se representan los factores de correlación dentro de un mismo sexo al comparar: peso tejido adiposo marrón (TAM) y masa grasa, peso TAM y masa magra. (Correlación de Pearson,  $p < 0,05$ ).

Además, tras la extracción de proteína del TAM se ha calculado la proporción de proteína en éste (Figura 4). Se aprecia el efecto sexo ( $p < 0,05$ , ANOVA de dos vías) en ambos grupos experimentales. En concreto, en ambas situaciones el peso de los machos es significativamente mayor que el de las hembras ( $p < 0,05$ , test U de Mann-Whitney).



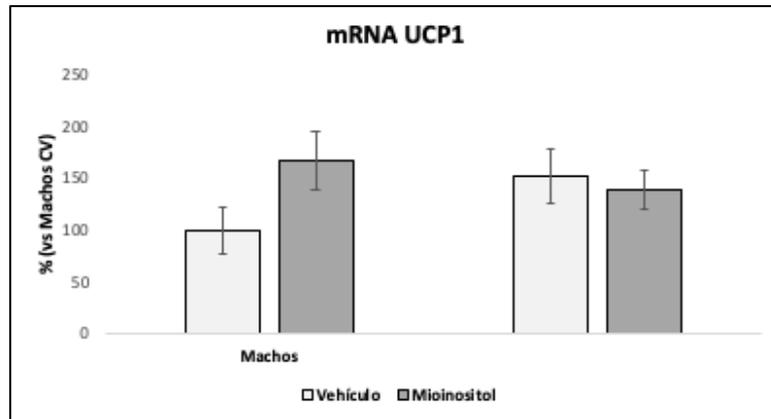
**Figura 4.** Concentración de proteínas totales en el tejido adiposo marrón (TAM) de las crías a los 7 meses de edad. Se muestran las medias  $\pm$  SEM y se expresa en  $\mu\text{g}$  de proteína por g de TAM. Estadística: ANOVA de dos vías ( $p < 0,05$ ), S: efecto sexo; #: hembra vs. macho (ambas condiciones), ( $p < 0,05$ , test U de Mann-Whitney).

#### 4.2 Expresión génica de *Ucp1* en el tejido adiposo marrón

En la Figura 5 se presenta la expresión del ARNm de *Ucp1* en el TAM de los distintos grupos a los 7 meses de edad.

Tras la ejecución de los test estadísticos se concluye que no se observan diferencias estadísticamente significativas en la expresión de *Ucp1*. Únicamente se experimenta un

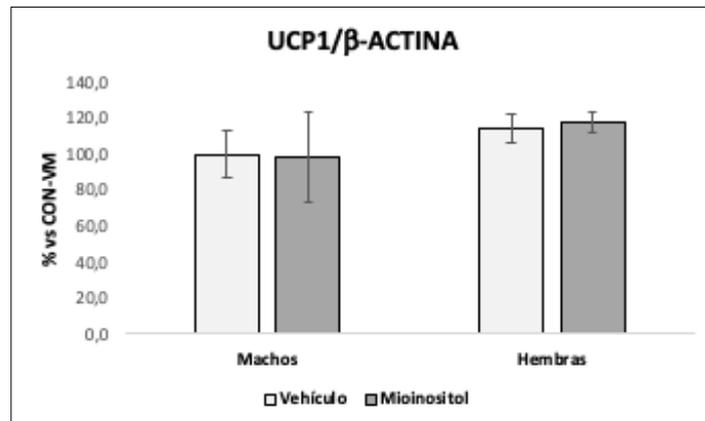
incremento no significativo de la expresión de *Ucp1* en machos suplementados con mioinositol, con respecto a los machos vehículo ( $p= 0,116$ , test U de Mann-Whitney).



**Figura 5.** Niveles de expresión del ARNm de la *Ucp1* en el tejido adiposo marrón de las crías a los 7 meses de edad. Se presentan las medias  $\pm$  SEM y se expresan en porcentaje de expresión de ARNm respecto al grupo de machos vehículo, que se ha ajustado al valor del 100 %. La corrección de los datos se ha llevado a cabo con el gen *Gdi* (*housekeeping*). No hay diferencias significativas en los test estadísticos ANOVA y U de Mann-Whitney.

#### 4.3 Niveles proteicos de UCP1 en el tejido adiposo marrón

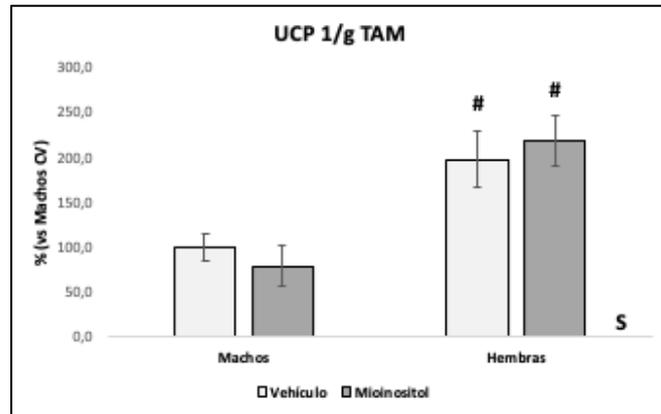
En la Figura 6 se muestran los niveles proteicos de UCP1 específica en el TAM de los grupos experimentales a los 7 meses de edad. Tras el análisis estadístico se concluye que no hay diferencias significativas en los niveles proteicos de UCP1 entre grupos ni sexos.



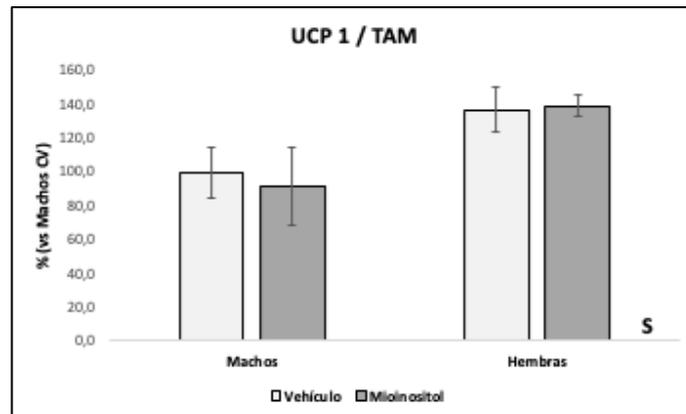
**Figura 6.** Niveles proteicos de UCP1 específica determinados por *western blot* de las crías a los 7 meses de edad. Se observan las medias  $\pm$  SEM y se expresan en porcentaje respecto al grupo de machos vehículo. La corrección de los datos se ha llevado a cabo por la  $\beta$ -ACTINA (*housekeeping*). Estadística: ANOVA de dos vías ( $p<0,05$ ) y test U de Mann-Whitney ( $p<0,05$ ). Sin diferencias significativas.

Además de los niveles proteicos de UCP1 específica en el TAM, en las figuras 7 y 8 se presentan los niveles de UCP1 por gramo de TAM y en todo el TAM, respectivamente. Ambas exponen diferencias entre sexos ( $p<0,05$ , ANOVA de dos vías), y, adicionalmente

en la figura 7, se muestra que el porcentaje de UCP1 por gramo de TAM en hembras es significativamente superior al de machos en ambas situaciones ( $p < 0,05$ , test U de Mann Whitney).



**Figura 7.** Niveles proteicos de UCP1 expresados por gramo de TAM determinados por *western blot* de las crías a los 7 meses de edad. Los datos son la media  $\pm$  SEM y están expresados en porcentaje respecto al grupo de machos vehículo. La corrección de los datos se ha llevado a cabo por la  $\beta$ -ACTINA (*housekeeping*). Estadística: S, efecto sexo, ( $p < 0,05$ , ANOVA de dos vías); #, hembra vs. macho (ambas condiciones), ( $p < 0,05$ , test U de Mann-Whitney).



**Figura 8.** Niveles proteicos de UCP1 determinados por *western blot* de las crías a los 7 meses de edad. Los datos son la media  $\pm$  SEM y están expresados en porcentaje respecto al grupo de machos vehículo. La corrección de los datos se ha llevado a cabo por la  $\beta$ -ACTINA (*housekeeping*). Estadística: S, efecto sexo, ( $p < 0,05$ , ANOVA de dos vías); #, hembra vs. macho (ambas condiciones), ( $p < 0,05$ , test U de Mann-Whitney).

## 5. DISCUSIÓN

El embarazo y la lactancia son dos procesos complejos que precisan de la adaptación de la madre para poder cubrir las necesidades del feto o neonato en etapas críticas del desarrollo <sup>42</sup>. Se sabe que, tanto la gestación como la lactancia, desempeñan un papel crucial en la correcta evolución del infante a causa de los eventos de programación metabólica que experimentan los individuos a lo largo de esta etapa de la vida <sup>17</sup>. Se ha

visto que gran parte de las alteraciones que tienen lugar en este periodo se generan como consecuencia de un cambio en el ambiente nutricional<sup>17</sup>. Es por este motivo por el cual es de suma importancia llevar un estilo de vida saludable, especialmente en mujeres gestantes y lactantes, puesto que, tanto por exceso como por defecto, la ingesta energética puede afectar a la salud metabólica de la progenie, incrementando su susceptibilidad a padecer obesidad u otras complicaciones<sup>17</sup>. Sin embargo, la ingesta excesiva de alimentos que se tienen a disposición en la mayoría de sociedades desarrolladas ha propiciado un aumento notable en la prevalencia a la obesidad, tanto en la edad adulta como en la infancia<sup>1</sup>. El incremento tan veloz en la cifra de afectados por esta patología ha supuesto un aumento en el número de estudios que se llevan a cabo relacionados con la obesidad y la búsqueda de mecanismos asociados a una mejora o erradicación de la enfermedad. Además del interés que genera el TAM como posible tratamiento contra la obesidad, debido a la estimulación del gasto energético que origina, se han descrito otros posibles puntos sobre los cuales se podría ejercer un control para disminuir el riesgo a padecer obesidad, como es el caso de la lactancia<sup>43</sup>.

La leche materna es la fuente exclusiva de alimentación del neonato durante su etapa crítica del desarrollo<sup>13</sup>. El hecho de que se sepa que en este periodo es cuando tienen lugar la mayor parte de los eventos de programación metabólica en el lactante, hace que sea posible inferir la riqueza nutritiva de la leche, dado que se asume que ésta es suficiente para abastecer sus necesidades nutricionales y permitir su desarrollo<sup>44</sup>. De hecho, se ha visto que la ausencia o una disminución del periodo de lactancia materna está asociado a un aumento en el riesgo de padecer problemas de salud en el infante, desde el riesgo incrementado a contraer infecciones del tracto respiratorio y gastrointestinal, hasta mayor susceptibilidad a ser obeso o desarrollar otras enfermedades metabólicas<sup>45</sup>. Por el contrario, la lactancia materna se vincula a efectos positivos en el neonato ya que se ha observado una reducción en el riesgo a padecer enfermedades como la diabetes o la obesidad en infantes alimentados con leche materna<sup>46</sup>. Estos beneficios hacen de la leche materna un claro objetivo para un gran número de estudios. Sin embargo, dada la complejidad de este alimento, todavía quedan por dilucidar muchos de los componentes que la integran. Además, resulta difícil la determinación de los distintos elementos, puesto que su composición está sujeta a continuos cambios en función de condiciones como la alimentación de la madre, las diferencias entre individuos, e incluso la etapa de la lactancia<sup>23</sup>. En un estudio previo realizado en ratas en el grupo de investigación de Nutrigenómica y Obesidad de la UIB, se pusieron de manifiesto 29 metabolitos de la leche materna que son significativamente distintos entre ratas control y ratas sometidas a una restricción calórica moderada durante la lactancia<sup>31</sup>. Resulta interesante conocer las diferencias que se dan en este caso, ya que se ha visto que las ratas expuestas a una restricción calórica moderada durante la lactancia contribuyen a la instauración de un fenotipo más saludable de la progenie en la edad adulta<sup>31</sup>. No obstante, todavía no se han determinado cuales serían los componentes de la leche materna implicados en la programación metabólica de la descendencia. Lo que sí se pudo apreciar en este estudio<sup>31</sup> fueron algunos de los metabolitos que podrían asociarse en mayor medida a los efectos positivos que se dan sobre el neonato y, uno de los que destacó, fue el mioinositol. Es por este motivo por el que, en el presente experimento, se ha efectuado la suplementación con mioinositol durante la lactancia, con el fin de inferir si este

compuesto bioactivo estaría implicado en la instauración del fenotipo saludable de la descendencia en la edad adulta.

En el presente estudio se pretende determinar si la suplementación con dosis fisiológicas de mioinositol durante la lactancia podría afectar a la programación del TAM. Si esto fuera así podría explicarse en cierta manera la menor predisposición de la descendencia a ser obesa ya que, si se estimulara la termogénesis en este tejido, incrementaría la tasa de oxidación de lípidos y se disiparía una mayor cantidad de energía en forma de calor, lo que se traduciría en una pérdida de peso <sup>47</sup>. El proceso de termogénesis adaptativa está mediado, principalmente, por la acción de la UCP1, cuya expresión se limita al TAM y a los adipocitos beige (adipocitos resultantes del proceso de marronización del tejido adiposo blanco) <sup>48</sup>. Por este motivo, para ver el efecto del mioinositol ingerido en dosis fisiológicas durante la lactancia sobre este tejido, se han estudiado los niveles de UCP1 y la expresión génica de *Ucp1* presente en el TAM de los diferentes grupos experimentales en edad adulta. Además, se han analizado parámetros de los animales como sus pesos, el peso del TAM y el peso de la masa grasa y magra para determinar si el mioinositol ejerce algún efecto sobre el peso y composición corporal.

En los resultados del peso corporal de la descendencia se observa como la suplementación con mioinositol durante la lactancia no determina un menor peso corporal en la edad adulta en ninguno de los dos sexos. De hecho, no se aprecia el efecto mioinositol ni en los datos mostrados de las ratas a los 7 meses, cuando estaban alimentadas con la dieta occidental, ni en el periodo previo al cambio de dieta estándar a dieta occidental a los 5 meses (resultados no mostrados). Parece ser que el tratamiento con mioinositol durante la lactancia no generaría diferencias en el peso corporal porque, además de los resultados obtenidos en este experimento, en otro estudio en el que compararon un grupo que había sido privado de mioinositol con otro suplementado con el mismo durante el periodo comprendido entre los días 6 y 16 de vida, tampoco se obtuvieron cambios en el peso <sup>51</sup>. Sin embargo, la suplementación durante 6 meses en humanos obesos con este compuesto bioactivo sí que parece potenciar una disminución del peso corporal <sup>52</sup>. Por otro lado, tal y como era de esperar, se han observado diferencias entre sexos, de manera que el peso de los machos es mayor que el de las hembras, tanto en el grupo control como en el tratamiento. Se sabe que los machos generalmente presentan mayor peso corporal que las hembras, por lo que es natural observar la diferencia de peso entre sexos <sup>49</sup>.

Un efecto similar es el que se da en la masa grasa. Se aprecia el efecto sexo, pero la masa grasa es prácticamente igual entre los controles y los suplementados con mioinositol durante la lactancia dentro de un mismo sexo. Ésta constituye un 23-25 % del peso corporal total de los animales. De igual manera que en el peso corporal, este porcentaje relativamente elevado se asocia a que los animales están bajo una dieta occidental, dieta que promueve la acumulación de grasa e incrementa el apetito <sup>50</sup>. Tras proceder a la realización de correlaciones de Pearson, únicamente se ha encontrado una correlación positiva entre el peso del TAM y la masa grasa en hembras, de manera que, cuanto mayor sea el contenido graso en estos animales, mayor será el peso del TAM. Los datos obtenidos para la masa magra resultan de interés puesto que, además de apreciarse diferencias entre sexos, siendo ésta mayor en machos, hay un efecto

interactivo entre sexo y mioinositol, de manera que se observa un incremento de la masa magra en machos que fueron tratados con mioinositol pero no en hembras. Por tanto, la suplementación con mioinositol durante la lactancia se asocia a una mayor masa magra en edad adulta pero solo en el caso de los machos. Una posible explicación sería que el mioinositol, al mimetizar el efecto de la insulina <sup>32</sup>, podría estimular la síntesis proteica en función de la proporción de aminoácidos incorporados a partir de la dieta, lo que contribuiría a un aumento de la masa magra en el caso de los machos. No obstante, parece haber un dimorfismo sexual, puesto que las hembras no experimentan cambios entre grupos. Pese a que no se hayan descrito diferencias significativas en el peso y grasa corporal por efecto de la suplementación con mioinositol durante la lactancia, dicho efecto del mioinositol sobre la masa magra de los machos podría ser indicativo de una mejor programación metabólica. Estos resultados están apoyados por otros obtenidos en la misma cohorte de animales por los miembros del grupo de investigación de Nutrigenómica y Obesidad, que muestran que los animales machos tratados con mioinositol presentan en edad adulta una mejora de la sensibilidad a la insulina <sup>55</sup>.

Respecto a los valores obtenidos para el peso del TAM, en éstos no se observa efecto del mioinositol ni en machos ni en hembras, pero sí un menor peso del TAM en hembras en comparación con los machos, tal y como era de esperar. Por tanto, el mioinositol parece no haber inducido un efecto positivo directamente sobre el TAM. Sin embargo, en lo que respecta al contenido proteico de este tejido, aquí también se observa un dimorfismo sexual, pero con la diferencia de que en este caso son las hembras, tanto las tratadas con el vehículo como con mioinositol, las que presentan una mayor concentración proteica en el TAM en comparación con los machos. Dichos resultados ya han sido previamente descritos en modelos animales, en los que asocian los mayores niveles proteicos en el TAM de las hembras a un incremento en la expresión de proteínas implicadas en la oxidación de las grasas y la termogénesis, así como a una disminución de la expresión de aquellas proteínas que intervienen en la síntesis de grasas <sup>53,54</sup>. Por tanto, parece ser que podría haber un mayor riesgo a padecer obesidad en machos, debido a una presunta menor actividad termogénica en comparación con las hembras. Por otro lado, se aprecia como la suplementación con mioinositol durante la lactancia no determina un aumento en la concentración de proteínas en el TAM con respecto al grupo control en ninguno de los dos sexos.

Como se ha comentado previamente, se ha descrito una mayor capacidad termogénica en hembras <sup>53,54</sup>, de manera que cabe esperar que también presenten una expresión incrementada de *Ucp1* en comparación con los machos. En el presente estudio se ha observado también una tendencia, aunque no significativa, a una mayor expresión génica de *Ucp1* en hembras en relación a los machos. Ahora bien, esta tendencia no se ha observado entre los animales tratados con mioinositol, ya que el mioinositol mostraría una tendencia a incrementar la expresión de *Ucp1* en machos, pero no en hembras. En cualquier caso, no se han encontrado diferencias significativas entre grupos, probablemente debido a la gran variabilidad encontrada entre los animales. Por tanto, estos resultados, aunque deberían confirmarse con estudios adicionales, sugieren que la suplementación con mioinositol durante la lactancia podría ejercer un ligero

efecto estimulando la expresión de la *Ucp1*, pero, ya que la proteína no se ve aumentada, no se puede concluir que la capacidad termogénica esté incrementada.

En cuanto a los niveles proteicos de UCP1 en el TAM, se aprecia como éstos no varían por el efecto de la suplementación con mioinositol durante la lactancia, sino que, tanto el grupo control como el mioinositol, presentan niveles similares tanto de los niveles específicos de UCP1, como de los referidos a gramo de TAM o a todo el tejido. Por otro lado, como cabía esperar según las conclusiones extraídas en estudios previos <sup>53,54</sup>, se aprecia un dimorfismo sexual y se ve como los niveles proteicos son superiores en hembras. Estas diferencias entre sexos observadas al calcular los niveles proteicos de UCP1 se magnifican al calcular la cantidad de UCP1 por tejido o por gramo de TAM.

Por tanto, a modo de recapitulación, cabe indicar que la suplementación con mioinositol durante la lactancia, aunque no tiene efectos sobre el peso y la grasa corporal, sí que se asocia a un incremento en la masa magra en machos, lo que podría estar asociado a la mejora en el estado metabólico que se ha descrito en estos animales, particularmente la mejora de la sensibilidad a la insulina en los machos <sup>55</sup> y no en las hembras. Además, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren un incremento, aunque no significativo, de la expresión génica de *Ucp1* en los animales de sexo masculino que fueron suplementados con mioinositol durante la lactancia, pero, por otro lado, no se aprecian cambios en los niveles proteicos de UCP1 entre los grupos vehículo y tratamiento. Por lo tanto, no puede concluirse que haya un incremento en la capacidad termogénica, ya que sería necesario realizar estudios adicionales. También es importante mencionar que este estudio forma parte de uno más amplio y, por tanto, los resultados deben interpretarse conjuntamente para poder sacar unas conclusiones sobre el efecto del mioinositol durante la lactancia sobre la programación metabólica. Finalmente es importante puntualizar que, al tratarse de experimentos con animales, a la hora de extrapolar estos conocimientos a humanos podrían obtenerse resultados diferentes.

## 6. CONCLUSIONES

1. La suplementación con dosis fisiológicas de mioinositol en ratas durante la lactancia no determina cambios en el peso corporal ni en la masa grasa de los animales en edad adulta, pero sí que se asocia a un aumento en la masa magra de los machos.
2. En relación al TAM, la suplementación con mioinositol durante la lactancia se asocia a un ligero incremento en la expresión de la *Ucp1* en dicho tejido en las ratas macho, si bien no se observan cambios en los niveles de la proteína UCP1. Por tanto, los resultados obtenidos no pueden asociarse directamente a una mejora de la capacidad termogénica.
3. En hembras, la suplementación con mioinositol durante la lactancia no parece mostrar un efecto positivo notable con respecto al grupo vehículo. Estos resultados sugieren que las ratas macho son más sensibles al efecto del mioinositol durante la lactancia en relación a la programación metabólica, al menos para la dosis y condiciones ensayadas en el presente estudio.

## **7. AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quería agradecer a mi tutora, la doctora Catalina Picó, el haberme dado la oportunidad, tanto de ser alumna colaboradora, como de realizar el Trabajo de Fin de Grado en su grupo de investigación. También agradecerle lo pendiente que ha estado de mí en todo momento y la amabilidad con la que me ha tratado siempre. En segundo lugar, quería agradecer a Pedro Castillo la ayuda que me ha prestado durante todos estos meses, ya que me ha resuelto las innumerables dudas que he podido tener, sin importarle las veces que me tuviera que repetir la explicación hasta que lo comprendiera. También dar las gracias en general a todo el grupo de investigación por hacerme sentir tan cómoda y por el buen trato que he recibido por su parte. Finalmente, me gustaría agradecer a mi familia todo el apoyo y el cariño que me dan siempre. Gracias por creer en mí, por estar siempre a mi lado y, sobre todo, por hacerme tan feliz.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Obesidad y sobrepeso. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Visitada en abril de 2020
2. Palou, A. & Bonet, M.L. Challenges in Obesity Research. *Nutr. Hosp.* **28 Suppl 5**, (2013).
3. Haslam, D.W. & Philip, J. Obesity. *Lancet (London, England)* **366**, (2005).
4. Singh, R.K., Kumar, P., & Kulandaivelu, M. Molecular Genetics of Human Obesity: A Comprehensive Review. *C. R. Biol.* **340**, (2017).
5. Oussaada, S.M. *et al.* The Pathogenesis of Obesity. *Metabolism.* **92**, (2019).
6. Bray, G.A., Kim, K.K., & Wilding, J.P.H. Obesity: A Chronic Relapsing Progressive Disease Process. A Position Statement of the World Obesity Federation. *Obes. Rev.* **18**, (2017).
7. Trandafir, L. & Temneanu, O. Pre and post-natal risk and determination of factors for child obesity. *J. Med. Life* **9**, 386 (2016).
8. Moreno Villares, J. M. Nutrition in early life and the programming of adult disease: the first 1000 days. *Nutr. Hosp.* **33**, 337 (2016).
9. Fernandez-Twinn, D. S. *et al.* Downregulation of IRS-1 in adipose tissue of offspring of obese mice is programmed cell-autonomously through post-transcriptional mechanisms. *Mol. Metab.* **3**, 325 (2014).
10. Bertram, C.E. & Hanson, M.A. Animal Models and Programming of the Metabolic Syndrome. *Br. Med. Bull.* **60**, (2001).
11. Tiffon, C. The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
12. Serrano, A. *et al.* DNA Methylation Changes Are Associated With the Programming of White Adipose Tissue Browning Features by Resveratrol and Nicotinamide Riboside Neonatal Supplementations in Mice. *Nutrients* **12**, (2020).
13. Castro, H., Pomar, C.A., Palou, A., Picó, C. & Sánchez, J. Offspring Predisposition to Obesity Due to Maternal-Diet-Induced Obesity in Rats Is Preventable by Dietary Normalization Before Mating. *Mol. Nutr. Food Res.* **61**, (2017).
14. Chen, P.Y. *et al.* Intrauterine Calorie Restriction Affects Placental DNA Methylation and Gene Expression. *Physiol. Genomics* **45**, (2013).
15. Carreras-Badosa, G. *et al.* Dysregulation of Placental miRNA in Maternal Obesity Is Associated With Pre- And Postnatal Growth. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **102**, (2017).
16. Ramírez-López, M. T. *et al.* The role of maternal diet in metabolic and behavioural programming: review of biologic mechanisms involved. *Nutr. Hosp.* **32**, 2433–45 (2015).
17. Lecoutre, S. *et al.* Depot- and sex-specific effects of maternal obesity in offspring's adipose tissue. *J. Endocrinol.* **230**, 39–53 (2016).
18. Sarr, O., Yang, K. & Regnault, T. R. H. In utero programming of later adiposity: the role of fetal growth restriction. *J. Pregnancy* **2012**, 134758 (2012).
19. Williams, L., Seki, Y., Vuguin, P. M. & Charron, M. J. Animal models of in utero exposure to a high fat diet: A review. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1842**, 507–519 (2014).
20. Breastfeeding. [https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab\\_2](https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab_2). Visitada en mayo de 2020

21. Segura, S.A., Ansótegui, J.A., & Díaz-Gómez, N.M. The Importance of Maternal Nutrition During Breastfeeding: Do Breastfeeding Mothers Need Nutritional Supplements?. *An. Pediatr. (Barc)*. **84**, (2016).
22. Formula, I. of M. (US) C. on the E. of the A. of I. N. to I. Comparing Infant Formulas with Human Milk. (2004).
23. Ballard, O. & Morrow, A. L. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr. Clin. North Am.* **60**, 49 (2013).
24. Eriksen, K.G., Christensen, S.H., Lind, M.V. & Michaelsen, K.F. Human Milk Composition and Infant Growth. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **21**, (2018).
25. Andreas, N. J., Kampmann, B. & Mehring Le-Doare, K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum. Dev.* **91**, 629–635 (2015).
26. Hill, D. R. & Newburg, D. S. Clinical applications of bioactive milk components. *Nutr. Rev.* **73**, 463 (2015).
27. Ferrari, F. *et al.* The Effect of Combined Inositol Supplementation on Maternal Metabolic Profile in Pregnancies Complicated by Metabolic Syndrome and Obesity. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **215**, (2016).
28. Formuso, C., Stracquadiano, M., & Ciotta, L. Myo-inositol vs. D-chiro Inositol in PCOS Treatment. *Minerva Ginecol.* **67**, (2015).
29. Pintaudi, B. *et al.* Effects of Myo-Inositol on Glucose Variability in Women With Gestational Diabetes. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **22**, (2018).
30. Croze, M.L. & Soulage, C.O. Potential Role and Therapeutic Interests of Myo-Inositol in Metabolic Diseases. *Biochimie* **95**, (2013).
31. Palou, M. *et al.* Metabolomic approach in milk from calorie-restricted rats during lactation: a potential link to the programming of a healthy phenotype in offspring. *Eur. J. Nutr.* **59**, 1191–1204 (2020).
32. Dang, N.T., Mukai, R., Yoshida, K.I. & Ashida, H. D-pinitol and Myo-Inositol Stimulate Translocation of Glucose Transporter 4 in Skeletal Muscle of C57BL/6 Mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, (2010).
33. Burton, L.E. & Wells, W.W. myo-Inositol Deficiency: Studies on the Mechanism of Lactation-Dependent Fatty Liver Formation in the Rat. *J. Nutr.* **109**, (1979).
34. Saely, C.H., Geiger, K. & Drexel, H. Brown Versus White Adipose Tissue: A Mini-Review. *Gerontology* **58**, (2012).
35. Chouchani, E.T., Kazak, L. & Spiegelman, B.M. New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metab.* **29**, (2019).
36. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol. Rev.* **84**, (2004).
37. Palou, A., Picó, C., Bonet, M.L. & Oliver, P. The Uncoupling Protein, Thermogenin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, (1998).
38. Fenzl, A. & Kiefer, F.W. Brown Adipose Tissue and Thermogenesis. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **19**, (2014).
39. Nolan, T., Hands, R. E. & Bustin, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* **1**, 1559–82 (2006).
40. Litovchick, L. Preparing Whole-Cell Lysates for Immunoblotting. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, (2018).
41. Walker, J. M. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol. Biol.* **32**, 5–8 (1994).

42. Johnson, M. L., Saffrey, M. J. & Taylor, V. J. Gastrointestinal capacity, gut hormones and appetite change during rat pregnancy and lactation. *Reproduction* **157**, 431–443 (2019).
43. Marlatt, K. L. & Ravussin, E. Brown Adipose Tissue: an Update on Recent Findings. *Curr. Obes. Rep.* **6**, 389–396 (2017).
44. Román Collazo, C., Hernández Rodríguez, Y. & Andrade Campoverde, D. Breastfeeding, metabolic programming and its relationship with chronic diseases. *Salud Uninorte* **34**, 126–143 (2018).
45. Stuebe, A. The risks of not breastfeeding for mothers and infants. *Rev. Obstet. Gynecol.* **2**, 222–31 (2009).
46. Binns, C., Lee, M. & Low, W. Y. The Long-Term Public Health Benefits of Breastfeeding. *Asia-Pacific J. public Heal.* **28**, 7–14 (2016).
47. Whittle, A. J., López, M. & Vidal-Puig, A. Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. *Trends Mol. Med.* **17**, 405–411 (2011).
48. Phillips, K. J. Beige Fat, Adaptive Thermogenesis, and Its Regulation by Exercise and Thyroid Hormone. *Biology (Basel)*. **8**, (2019).
49. Pullen, A. H. A parametric analysis of the growing CFHB (Wistar) rat. *J. Anat.* **121**, 371–83 (1976).
50. Kopp, W. How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases. *Diabetes. Metab. Syndr. Obes.* **12**, 2221–2236 (2019).
51. Burton, L. E. *et al.* myo-Inositol Metabolism in the Neonatal and Developing Rat Fed a myo-Inositol-free Diet. *J. Nutr.* **106**, 1610–1616 (1976).
52. Le Donne, M., Metro, D., Alibrandi, A., Papa, M. & Benvenga, S. Effects of three treatment modalities (diet, myoinositol or myoinositol associated with D-chiro-inositol) on clinical and body composition outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **23**, 2293–2301 (2019).
53. Choi, D. K. *et al.* Gender difference in proteome of brown adipose tissues between male and female rats exposed to a high fat diet. *Cell. Physiol. Biochem.* **28**, 933–48 (2011).
54. Rodríguez, A. M., Quevedo-Coli, S., Roca, P. & Palou, A. Sex-dependent dietary obesity, induction of UCPs, and leptin expression in rat adipose tissues. *Obes. Res.* **9**, 579–88 (2001).