



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE GRADO

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA A DURANTE LA LACTANCIA SOBRE EL HÍGADO DE CRÍAS DE RATÓN DE MADRES ALIMENTADAS CON UNA DIETA OBESOGÉNICA

Laura Pons Salom

Grado de Bioquímica

Facultad de Ciencias

Año Académico 2021-2122

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA A DURANTE LA LACTANCIA SOBRE EL HÍGADO DE CRÍAS DE RATÓN DE MADRES ALIMENTADAS CON UNA DIETA OBESOGÉNICA

Laura Pons Salom

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2021-22

Palabras clave del trabajo:

Vitamina A, lactancia, programación metabólica, dieta HFHS, adiposidad, hígado.

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo: Joan Ribot Riutort

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"/>

Resumen

La suplementación en la lactancia con compuestos presentes en la leche materna como la vitamina A y el β -caroteno (BC), de los que se ha estudiado extensamente su impacto en la protección ante la obesidad o en la biología del tejido adiposo de animales adultos, así como su crucial implicación en el desarrollo fetal, podría ser de interés para la reversión de los efectos que tiene seguir una dieta rica en grasa y azúcar (HFHS) en la programación metabólica, la cual podría tener implicaciones en la salud de la descendencia tanto a corto como a largo plazo. Para este estudio 13 ratones hembra recibiendo o bien una dieta HFHS (WD) durante la periconcepción, gestación y amamantamiento, o una dieta control. A partir del día 2 después del nacimiento las crías del grupo WD recibieron una dosis oral diaria correspondiente a un exceso moderado de 3 veces la vitamina A ingerida naturalmente vía leche materna de *retinyl* palmitato (RP) o BC, y el resto de las crías, incluidas las de madres control, recibieron el vehículo (8 animales por grupo: 4 machos y 4 hembras). Los tratamientos duraron los 21 días de lactancia y los animales se sacrificaron a día 26 de vida. La dieta HFHS en la etapa perinatal incrementa el peso corporal, la glucemia, la adiposidad corporal y los triglicéridos hepáticos y, un exceso moderado de vitamina A en forma de BC atenúa el incremento de la adiposidad corporal especialmente en machos y en los depósitos adiposos retroperitoneal y gonadal. El RP, que no atenuó el incremento de la adiposidad corporal, incrementó la acumulación de triglicéridos en el hígado especialmente en asociado al mantenimiento de la capacidad de captación de lípidos y a una disminución de la capacidad oxidativa de las mitocondrias en el hígado. Se necesita más investigación para estudiar los efectos en la edad adulta. Los resultados podrían tener implicaciones para las pandemias de obesidad y, en particular, para la obesidad infantil, ya que el contenido de vitamina A de la leche humana está relacionado con el estado y la ingesta materna de vitamina A durante la lactancia.

Abstract

Supplementation in lactation with compounds present in breast milk such as vitamin A and β -carotene (BC), which have been extensively studied for their impact on obesity protection or adipose tissue biology in adult animals, as well as for their crucial involvement in fetal development, could be of interest for the reversal of the effects of following a high fat, high sugar diet (HFHS) on metabolic programming which could have implications for offspring health in both short and long term. For this study 13 female mice received either an HFHS diet (WD) during periconception, gestation and lactation or a control diet. From day 2 after birth the pups in the WD group received a daily oral dose corresponding to a moderate excess of 3 times the naturally ingested vitamin A via breast milk of *retinyl* palmitate (RP) or BC, and the rest of the pups, including those from control dams, received vehicle (8 animals per group: 4 males and 4 females). Treatments lasted for the 21

days of lactation and animals were sacrificed at day 26 of life. The HFHS diet in the perinatal stage increases body weight, glycaemia, body adiposity and hepatic triglycerides. A moderate excess of vitamin A in the form of BC attenuates the increase in body adiposity especially in males and in retroperitoneal and gonadal adipose deposits. RP, which did not attenuate the increase in body adiposity, increased triglyceride accumulation in the liver especially in association with maintenance of lipid uptake capacity and decreased oxidative capacity of mitochondria in the liver. More research is needed to study the effects in adulthood. The results could have implications for obesity pandemics and in particular for childhood obesity, as the vitamin A content in human milk is related to maternal vitamin A status and intake during lactation.

Resum

La suplementació a la lactància amb compostos presents a la llet materna com la vitamina A i el β -carotè (BC), dels quals s'ha estudiat extensament el seu impacte en la protecció contra l'obesitat o en la biologia del teixit adipós d'animals adults, així com la seva crucial implicació en el desenvolupament fetal, podria ser d'interès per a la reversió dels efectes que té seguir una dieta rica en greix i sucre (HFHS) en la programació metabòlica, que podria tenir implicacions en la salut de la descendència tant a curt com a llarg termini. Per a aquest estudi 13 ratolins femella reberen o bé una dieta HFHS (WD) durant la periconcepció, gestació i alletament, o una dieta control. A partir del dia 2 després del naixement les cries del grup WD van rebre una dosi oral diària corresponent a un excés moderat de 3 vegades la vitamina A ingerida naturalment via llet materna de *retinyl* palmitat (RP) o BC, i la resta de cries, incloses les de les mares control, van rebre el vehicle (8 animals per grup: 4 mascles i 4 femelles). Els tractaments es van donar durant els 21 dies de lactància i els animals es van sacrificar a dia 26 de vida. La dieta HFHS a l'etapa perinatal incrementa el pes corporal, la glucèmia, l'adipositat corporal i els triglicèrids hepàtics i, un excés moderat de vitamina A en forma de BC atenua l'increment de l'adipositat corporal especialment en mascles i als dipòsits adiposos retroperitoneal i gonadal. El RP, que no va atenuar l'increment de l'adipositat corporal, va incrementar l'acumulació de triglicèrids al fetge especialment en associat al manteniment de la capacitat de captació de lípids i a una disminució de la capacitat oxidativa dels mitocondris al fetge. Cal més investigació per estudiar els efectes a l'edat adulta. Els resultats podrien tenir implicacions per a les pandèmies d'obesitat i, en particular, per a l'obesitat infantil, ja que el contingut de vitamina A de la llet humana està relacionat amb l'estat i la ingesta materna de vitamina A durant la lactància.

Índice de contenidos

1. Introducción	4
1.1. Programación metabólica en la etapa de lactancia	5
2. Objetivos	9
3. Materiales y métodos	10
3.1. Búsqueda bibliográfica	10
3.1.1. Primera búsqueda. Conocimiento del estado del arte	10
3.1.2. Segunda búsqueda. Identificación y selección de genes clave.....	11
3.2. Diseño experimental	12
3.2.1. Modelo animal y dieta	12
3.3. Determinación de la expresión génica de los genes seleccionados mediante RT-PCR a tiempo real	14
3.3.1. Extracción ARN	14
3.3.2. Cuantificación ARN	15
3.3.3. RT.....	15
3.3.4. PCR	16
3.3.5. Análisis de la expresión génica	16
3.4. Determinación de triglicéridos en hígado.....	17
3.5. Análisis estadístico de los datos	18
4. Resultados	19
4.1. Análisis de la composición corporal.....	19
4.2. Análisis del estado hepático y expresión génica	21
5. Discusión de los resultados	23
6. Conclusiones	27
7. Referencias bibliográficas.....	28

1. Introducción

En los últimos años, el entorno fetal y los primeros meses de vida han sido reconocidos como periodos especiales en los que el individuo en formación es susceptible a adaptarse a los cambios del entorno, referidos, entre otros, a las condiciones maternas como el estatus metabólico, hormonal o el tipo de dieta, para asegurar su supervivencia; adaptaciones que puede mantener y que pueden dejar de ser ventajosas en la edad adulta¹. Esta idea surgida hace alrededor de treinta años sigue siendo conocida actualmente bajo el concepto “El origen de la salud y la enfermedad durante el desarrollo” o, originalmente en inglés, “*The Developmental Origin of Health and Disease*”, lo que fue construido a partir del descubrimiento de la programación fetal causada por la malnutrición de la madre durante la gestación imprimiendo al recién nacido con un alto riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares cuando se convierta en adulto². En este contexto, se publicaron las primeras evidencias que afirmaron que el desarrollo fetal, así como otras etapas tempranas como la lactancia y la etapa inmediatamente anterior a la concepción surgen como “ventanas de programación” y, que, alteraciones durante estas fases pueden causar efectos en la salud de la descendencia, teniendo influencia en el desarrollo de patologías o aumentando la susceptibilidad a padecerlas tanto a corto como a largo plazo³.

Actualmente, son numerosas las evidencias que relacionan el estilo de vida materno con estos efectos en la descendencia, tomando especial importancia el estado nutricional de la madre, así como la composición dietética materna durante el embarazo y el periodo de lactancia^{4,5}. La mayoría de estudios realizados, sobre todo en roedores, muestran que el seguimiento de dietas obesogénicas durante estos periodos puede tener efectos adversos en la prole incluyendo una mayor adiposidad, no implicando necesariamente un aumento de peso corporal, así como una peor respuesta metabólica a la glucosa y alteraciones variadas en el perfil lipídico, entre otros⁶⁻⁸. Asimismo, la obesidad materna también es un factor clave en el desarrollo de alteraciones endocrinas de la descendencia relacionada con un aumento en el riesgo de patologías metabólicas como la obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares y alteraciones hepáticas como el hígado graso¹.

No obstante, a pesar de que los mecanismos y el impacto que puede tener esta programación a distintos niveles podrían ser varios y aún no se comprenden en su totalidad, se ha evidenciado que el consumo de dietas ricas en grasa durante la gestación y/o la lactancia de madres no necesariamente obesas puede tener un papel central en esta programación, lo que parece significar que la composición de la dieta que recibe la madre en la etapa perinatal es un estímulo

más significativo que la obesidad anterior a la concepción en el impacto que tienen estas condiciones en la salud de la descendencia^{5,6}.

Programación metabólica en la etapa de lactancia

Una respuesta puede estar en la composición de la leche materna en la salud de la progenie. De forma paralela al conocimiento de los efectos de la dieta materna y el estatus metabólico de la madre durante la gestación sobre etapas postnatales, se ha evidenciado, sobre todo en roedores, que la leche de madres obesas predispone a la obesidad de las crías y, que, en contrapartida, la leche de madres no obesas protege de la obesidad a crías gestadas en un entorno obesogénico^{1,9}. Así pues, la leche materna posee gran multitud de componentes entre los cuales se encuentran; hormonas, compuestos bioactivos, inmunoglobulinas y citoquinas, entre muchos otros, que la hacen responsable tanto de la maduración de órganos y sistemas como de la salud del recién nacido a largo plazo¹⁰. Además, cabe comentar, que diversos factores como la etapa de lactancia (calostro/leche madura), el momento del día o condiciones ambientales como la dieta o el estatus metabólico de la madre pueden cambiar su composición y su volumen, por lo que además de ser la nutrición de preferencia en primeras etapas de la vida, podría ser un fluido susceptible a suplementación para mejorar la salud en etapas postnatales¹⁰.

La lactancia puede ser una etapa crítica en la malprogramación metabólica confiriendo una mayor predisposición a sufrir obesidad o alteraciones a largo plazo a partir de madres siguiendo dietas obesogénicas en la gestación y la lactancia¹¹. Numerosas evidencias, sobre todo en estudios realizados con animales, han demostrado que una composición alterada de la leche materna causada por la obesidad de la madre gestante o una dieta desequilibrada, puede tener un impacto negativo en el desarrollo del recién nacido de varias maneras^{6,12,13}. Habiéndose observado que existe una correlación directa entre el índice de masa corporal (IMC) de la madre y/o el porcentaje de adiposidad materna con una mayor concentración de lípidos en la leche, así como también, la influencia de dietas ricas en grasa y azúcar en el aumento de triglicéridos en la leche, lo que además se relaciona con un mayor riesgo de sobrepeso, inflamación, un peor manejo de la glucemia de la descendencia, entre otros^{10,14}.

Por otra parte, el ambiente o las condiciones maternas pueden conferir cierta protección en relación al desarrollo de estas alteraciones, sabiendo que mejoras nutricionales, la suplementación con compuestos bioactivos o medidas como la restricción calórica en la lactancia podrían estar implicadas en esta programación^{15,16}. Sin embargo, en general, los

estudios que abordan el impacto de micronutrientes específicos en la programación metabólica de la obesidad son escasos.

Vitamina A y estudios recientes sobre la etapa perinatal

La vitamina A, en este sentido, es un micronutriente que se implica en la biología del sistema adiposo y se encuentra mayoritariamente en la dieta en forma de ésteres de retinilo (*retinyl esters*), en alimentos de origen animal o en vegetales y frutas en forma de carotenoides provitamina A, mayoritariamente como β -caroteno¹⁷.

Cabe destacar que ambas formas de vitamina A son inicialmente metabolizadas en el intestino, sabiendo que los ésteres de retinilo son hidrolizados a retinol, para poder ser así absorbidos y, el β -caroteno, es escindido rindiendo dos moléculas de retinaldehído (o retinal) por acción de la enzima β -caroteno 15-15' oxigenasa (BCO1), este retinal será reducido a retinol por retinol deshidrogenasas, el cual ya puede absorberse en los enterocitos⁴. El retinol resultante, obtenido a partir de ambas formas dietéticas de vitamina A, es esterificado formando ésteres de retinilo que formarán parte de quilomicrones que llegarán al tejido adiposo y, en quilomicrones remanentes, llegando así al hígado, tejido en el que mayoritariamente se almacena y metaboliza esta vitamina y, que por ende, se encarga de controlar la distribución a otros tejidos¹⁸.

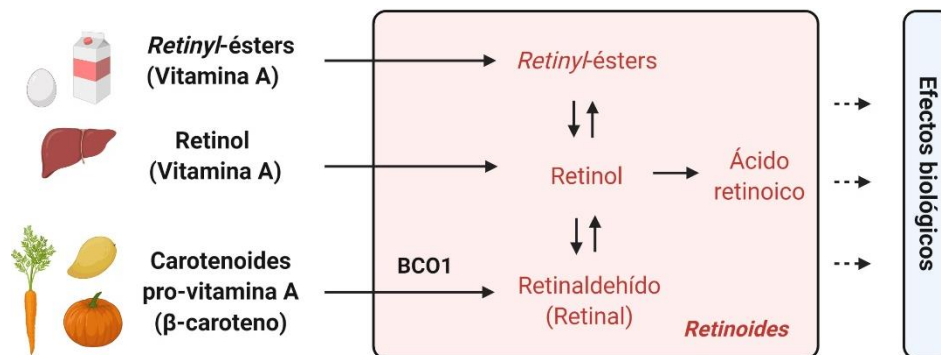


Figura 1. Esquema simplificado de la relación entre las distintas formas de retinoides en tejidos de mamíferos. No se representan carotenoides no pro-vitamina A ni sus productos metabólicos. Adaptado de^{18,19}.

Adicionalmente, la forma activa mayoritaria de vitamina A es el ácido retinoico (AR), más concretamente *all-trans-AR*, que se sintetiza intracelularmente a partir retinaldehído, obtenido tanto de retinol como de β -caroteno⁴. Este *all-trans-AR* considerado un importante regulador de la expresión génica ya que actúa sobre receptores nucleares específicos (receptores de AR, RAR y receptores retinoides, RXR) y, por tanto, es responsable de parte de los efectos biológicos que tiene la vitamina A⁴.

Una de las funciones biológicas reconocidas que lleva a cabo esta vitamina *per se*, así como los carotenoides provitamina A (β -caroteno, principalmente) es la de asistir en procesos fundamentales como son la concepción y el correcto desarrollo fetal⁴. Así pues, el estado nutricional materno antes durante y después el embarazo puede influir en las reservas de esta vitamina en el recién nacido, así como en la concentración de estos compuestos la leche materna, siendo un fluido rico en carotenoides sobre todo en la formación del calostro, y que, en el recién nacido, constituye la principal fuente de esta vitamina⁴. Por tanto, los carotenoides de la leche materna y la ingesta de alimentos ricos en las formas dietéticas de vitamina A durante la etapa perinatal promueven conjuntamente que el recién nacido disponga de unos niveles adecuados de esta vitamina, crucial para su desarrollo⁴.

Además, la bibliografía que relaciona la vitamina A y sus compuestos derivados con efectos “antiobesogénicos” en el control de la adiposidad corporal es extensa^{17,20,21}. Sin embargo, poco se conoce en cuanto al impacto que esta tiene en etapas tempranas de la vida sobre factores relacionados con la salud metabólica. Así pues, en un estudio llevado a cabo por *Musinovic et al.*²² se observó como un exceso moderado de vitamina A (3x la ingerida vía leche materna) en forma de *retinyl* palmitato suministrado a crías de rata diariamente durante el período de lactancia dio lugar a cambios en la celularidad y en la expresión génica del tejido adiposo en el momento del destete, relacionados con un mayor desarrollo de este tejido y, además, a largo plazo, esta suplementación mostró predisponer para una mayor ganancia de adiposidad corporal en respuesta a una dieta rica en grasa (HFD) en etapas posteriores²².

Paralelamente, el β -caroteno funciona como un precursor de retinoides vitamina A (retinol, retinal y ácido retinoico) en mamíferos, además de poseer actividades independientes¹⁸. Este carotenoide ha sido relacionado extensamente, tanto en humanos como en animales adultos, con una menor adiposidad corporal, además de encontrarse en bajas concentraciones en los adipocitos de humanos con obesidad^{18,23}, sin embargo, los efectos que podría tener en etapas tempranas del desarrollo con implicaciones a largo plazo requiere un estudio más exhaustivo. En línea a lo estudiado por *Musinovic et al.*²², los mismos autores decidieron estudiar los efectos de la vitamina A, esta vez en forma de β -caroteno, también en la lactancia y en el mismo exceso (3x). En este segundo estudio, se pudo observar que esta segunda forma dietética de vitamina A no tiene los mismos efectos sobre el tejido adiposo en desarrollo que en el caso del *retinyl* palmitato²⁴, mostrando que este carotenoide no tiene efectos promotores de la obesidad y además, se pudo observar que se deposita en menor medida en el tejido adiposo teniendo la

mayoría de respuestas transcripcionales, mediadas por ácido retinoico, en el intestino y en el hígado de las ratas suplementadas con este compuesto en la lactancia²⁴.

En definitiva, en estos dos estudios se evidenció que la suplementación con vitamina A en la lactancia en forma de *retinyl* palmitato da lugar a cambios en el tejido adiposo favoreciendo una mayor susceptibilidad a la ganancia de adiposidad en consecuencia a la ingesta de una dieta obesogénica en etapas posteriores y que, dosis equivalentes de la vitamina en forma de β -caroteno no tienen los mismos efectos. Esta idea fue posteriormente respaldada por un estudio reciente del mismo grupo de investigación, en el que la suplementación con ambas formas de vitamina A en etapas postnatales tempranas tiene un impacto diferente en cuanto a las marcas epigenéticas del tejido adiposo en desarrollo, sugiriendo de este modo que ambos compuestos pueden afectar a la actividad de programación del tejido adiposo aunque de distintas maneras²⁵.

Por lo que, con el conocimiento actual de que la dieta materna tiene una programación en la salud de la descendencia a corto y a largo plazo, para el presente trabajo se planteó averiguar si un exceso moderado de vitamina A en forma de *retinyl* palmitato o β -caroteno durante el período de lactancia puede modificar la mala programación metabólica asociada a una dieta materna desequilibrada durante la gestación y la lactancia, a corto y largo plazo, centrándose la presente memoria en los efectos de esta suplementación a corto plazo y, en especial sobre los efectos del hígado.

2. Objetivos

La suplementación en la lactancia con compuestos presentes en la leche materna como la vitamina A y el β -caroteno, de los que se ha estudiado extensamente su impacto en la protección ante la obesidad o su papel en la biología del tejido adiposo en animales adultos, podrían ser de interés para la reversión de los efectos que se ha comentado que tiene la malnutrición materna en la descendencia, por lo que los objetivos principales del trabajo son:

1. Confirmar que una dieta materna desequilibrada durante la periconcepción, gestación y amamantamiento puede conducir a alteraciones en el peso, adiposidad corporal y metabólicas, centradas en el hígado, en la descendencia a corto plazo.
2. Estudiar si un exceso moderado de vitamina A, en forma *retinyl* palmitato o β -caroteno, durante el período de lactancia puede modificar los efectos de la dieta obesogénica materna en los animales jóvenes, en un sentido u otro, y si ambos compuestos tienen impactos distintos en este efecto.
3. Estudiar si existen diferencias entre sexos en relación a los aspectos estudiados en los objetivos 1 y 2.

3. Materiales y métodos

3.1. Búsqueda bibliográfica

Previamente al inicio de la parte experimental en el laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica para poder conocer el estado actual de los conocimientos y ampliar así el conocimiento sobre el tema, así como para la selección de genes clave y para la redacción del apartado de introducción y la discusión de los resultados. La búsqueda bibliográfica desde un principio se centró en dos búsquedas independientes, la primera basada en la búsqueda general para el conocimiento del tema y la redacción de los apartados mencionados, y, la segunda siendo una búsqueda concreta para la identificación y posterior selección de genes clave que su análisis en el laboratorio pueda permitir responder a los objetivos del trabajo.

3.1.1. Primera búsqueda. Conocimiento del estado del arte

En primer lugar, se llevó a cabo la búsqueda general en la base de datos *PubMed* que, aparte de proporcionar una visión del estado actual de los conocimientos generales, ha permitido la redacción de los apartados *Introducción y Discusión de los resultados*. Esta búsqueda, de la que se detalla el flujo de búsqueda bibliográfica en la *Figura 2*, se estructuró teniendo en cuenta el objetivo del trabajo, así pues, se dividió en tres estructuras iniciales, una que permitiera relacionar los efectos de dietas ricas en grasa en la gestación y/o lactancia (*High-fat diet OR Western diet*) AND (*Maternal Offspring OR Lactation*), de la que se obtuvieron 485 resultados, otra estructura de búsqueda para evaluar el papel de la vitamina A en la programación metabólica (*Maternal offspring OR Lactation*) AND (*Vitamin A OR Carotene*) que dio lugar a 117 resultados y, finalmente, se buscaron revisiones recientes que relacionaran alteraciones hepáticas con la dieta materna mediante la tercera estructura de búsqueda (*Liver disease*) AND (*Maternal diet*) AND (*High-fat diet OR Western diet*) resultando en 111 revisiones. Asimismo, los criterios de búsqueda adicionales para ambas estructuras fueron: publicaciones entre el 2014 y la actualidad y que las palabras clave mencionadas se encontraran específicamente en el título y/o en el resumen (o *abstract*) de las publicaciones. Aún así, si en el momento de redactar la memoria se han leído artículos anteriores a esta fecha que hayan sido relevantes en la adquisición de conocimientos se han incluido igualmente.

De las 713 publicaciones obtenidas en estas tres búsquedas iniciales se procedió a leer los títulos, descartándose en esta primera lectura 603 publicaciones, seguidamente, se procedió a la lectura del resumen de las publicaciones restantes eliminándose los que no estuvieran

centrados con el tema del trabajo y, por tanto, se seleccionaron 43 para su lectura completa, sirviendo como antecedentes directos principales para la elaboración de la presente memoria.

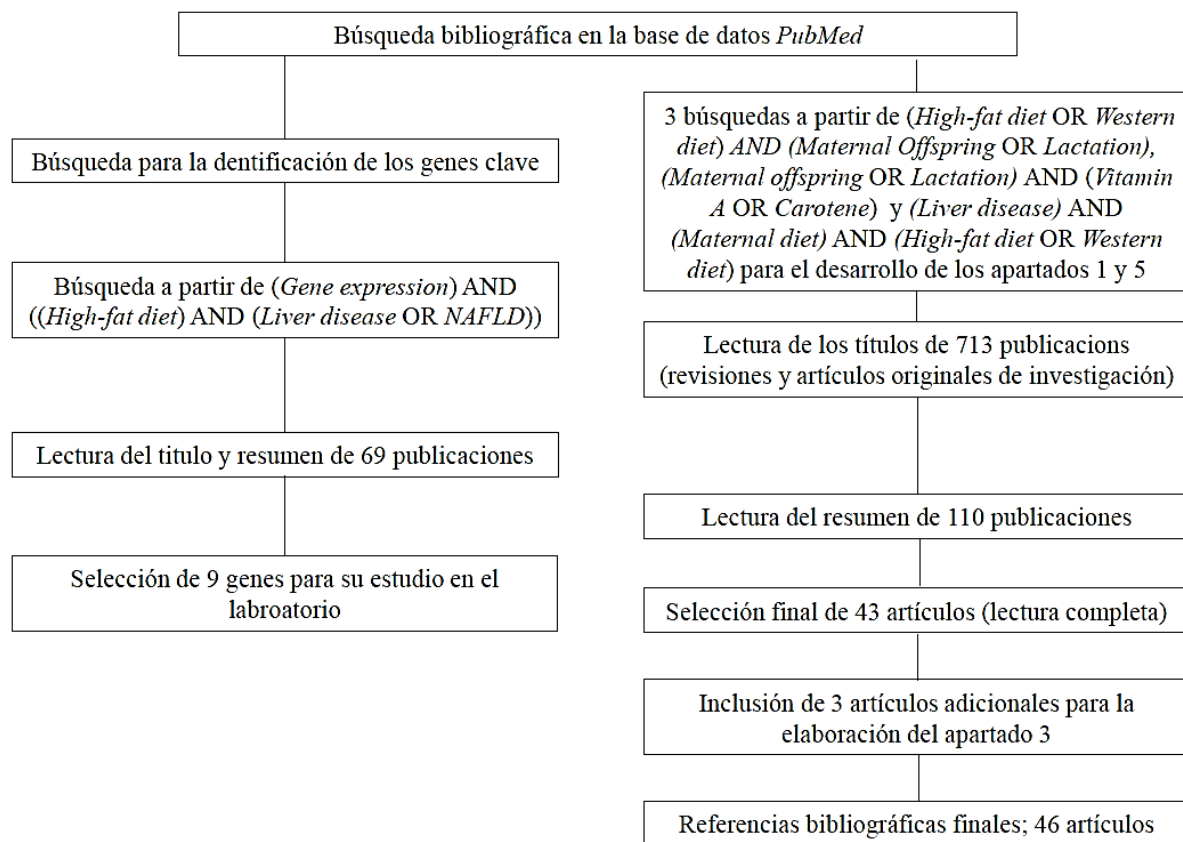


Figura 2. Diagrama de flujo de la búsqueda bibliográfica para el desarrollo del trabajo

3.1.2. Segunda búsqueda. Identificación y selección de genes clave

Esta búsqueda tuvo como objetivo la identificación de genes clave y su posterior elección para el análisis en el laboratorio, identificando genes que permitan relacionar el funcionamiento, la inflamación e integridad hepática con una dieta rica en grasa y que permitan evaluar posteriormente si esta puede ser modulada por la suplementación con vitamina A. Para la selección de genes alterados por seguir una HFD y que se impliquen en la inflamación o en la integridad intestinal, se utilizó la búsqueda *(Gene expression) AND ((High-fat diet) AND (Liver disease OR NAFLD))* obteniéndose 69 publicaciones.

A partir de una lectura inicial de los títulos y mediante la seguida lectura de los resúmenes y de las publicaciones más relevantes para el trabajo se seleccionaron los genes clave para estudiar su expresión génica en el laboratorio bajo las condiciones de la presente investigación, permitiendo así responder a los objetivos del trabajo. Los genes más representativos para la presente investigación se agruparon en las categorías: (i) marcadores de inflamación

relacionados con dietas ricas en grasa, (ii) genes relacionados con el metabolismo lipídico y (iii) relacionados con el metabolismo de la vitamina A.

Los genes seleccionados agrupados por categorías fueron:

- i. Marcadores de inflamación: $Tnf\alpha$, Il-6, Sod2.
- ii. Metabolismo lipídico: Cpt1 α , Ucp2, Scd1, Cd36, Cox2.
- iii. Metabolismo de la vitamina A: Cyp26a1.

3.2. Diseño experimental

3.2.1. Modelo animal y dieta

Los procedimientos en animales fueron llevados a cabo siguiendo los protocolos revisados y aprobados por el Comité Bioético de la Universidad de las Islas Baleares, además, fueron llevados a cabo por personal capacitado según la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que manipule los animales, siendo yo misma partícipe de estos procedimientos juntamente con más investigadores del grupo de investigación al disponer del título requerido para la experimentación animal en roedores sumando de este modo las horas necesarias para adquirir la certificación práctica de mi titulación.

Los animales con los que se empezó la investigación fueron 13 ratones hembra C57BI/6J (un modelo animal extensamente utilizado en la adquisición de obesidad inducida por la dieta²⁶), que fueron divididos en 2 grupos experimentales iniciales (tal como se muestra en la *Figura 3*); 3 ratones formaron el grupo control (CO), los cuales recibieron una dieta estándar y, los 10 restantes recibieron una dieta alta en azúcar y grasa (WD o HFFS) durante todo el transcurso de la experimentación, con libre acceso tanto a comida como a agua. Pasados 23 días, estas hembras fueron cruzadas con machos C57BI/6J en normopeso y recibiendo una dieta estándar (evitando así efectos de programación paterna), desde el inicio de la experimentación las madres y las dietas que ingirieron fueron pesadas y anotadas cada dos días.

Después de la gestación y del nacimiento de las crías, en su segundo día de vida, fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos experimentales y fueron suplementadas diariamente hasta el destete (a los 21 días) oralmente con una pipeta con el tratamiento pertinente. Las crías que recibiendo la dieta materna asignada al inicio del estudio fueron sacrificadas a día 26. Los grupos experimentales fueron: 8 crías control de madres recibiendo la dieta estándar (CO) que fueron suplementadas con aceite de oliva (vehículo), 8 crías de madres recibiendo WD que recibieron también aceite de oliva (WD), 8 crías de madres WD suplementadas con *retinyl*

palmitato (WD+RP) y 9 crías de madres WD suplementadas con β -caroteno (WD+BC). Se compensaron las camadas para que la distribución entre ambos sexos fuera igual en cada grupo experimental.

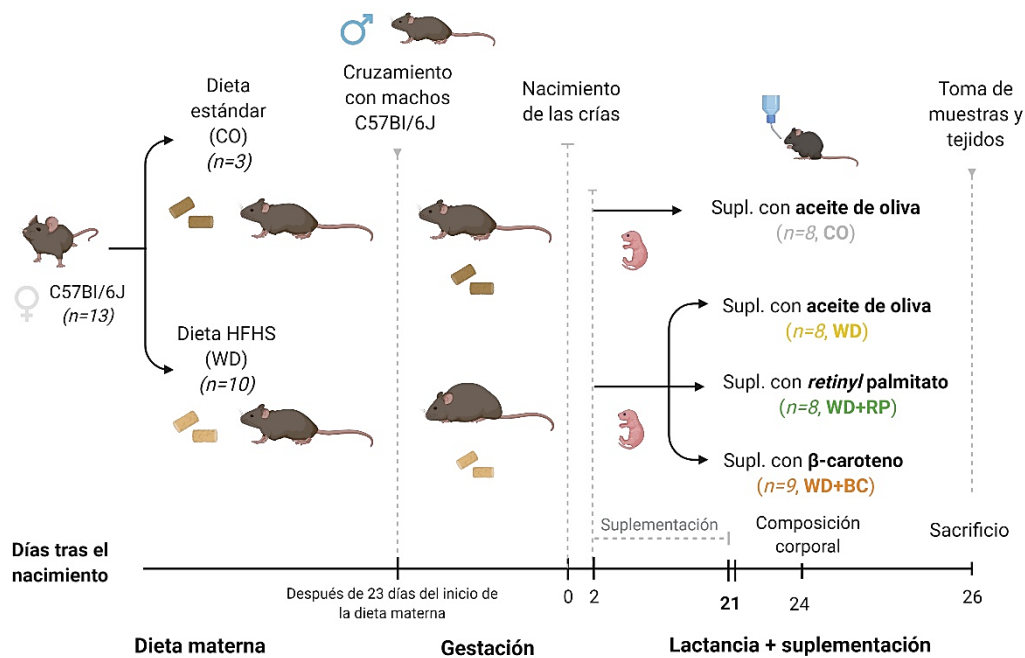


Figura 3. Esquema del diseño experimental (creado en BioRender.com)

Las crías recibieron 3 veces la concentración de *retinyl esters* presentes en la leche materna (3,41 $\mu\text{g/mL}$) documentada por O'Byrne *et al.*²⁷ en forma de *retinyl* palmitato o su dosis equivalente de retinol en forma de β -caroteno. El tratamiento fue preparado diariamente recibiendo 10 μL totales/cría/día (de aceite de oliva). La cantidad suplementada se ajustó al contenido total de *retinil* éster en la leche, la ingesta diaria estimada de leche de las crías de ratón fue descrita por Rath *et al.*²⁸ (que aumenta a lo largo del período de lactancia) y la equivalencia de vitamina A de BC (VEB) en aceite y en animales lactantes que había utilizado el grupo previamente (2,4–2,5:1)²⁴. La cantidad diaria exacta dada fueron 7,1 μg el segundo día de vida, 8,7 μg del día 3 al día 6, 9,7 μg del día 7 al 10, 1'14 μg del día 11 al día 15 y 1'3 μg desde el día 16 hasta el destete) de *retinyl* palmitato y 9,7 μg el segundo día de vida, 1,15 μg del día 3 al día 6, 1,33 μg del día 7 al 10, 1,55 μg del día 11 al día 15 y 1,77 μg desde el día 16 hasta el destete de β -caroteno. La suplementación se mantuvo durante los 21 días de lactancia siendo administrada diariamente a la misma hora aproximadamente y asegurando siempre la toma completa del tratamiento.

El análisis de la composición corporal de las crías se analizó en el día 24 en un equipo de resonancia magnética de imagen *Echo MRI-700* (3 días después de que finalizara el tratamiento). Asimismo, los pesos de las crías se tomaron diariamente desde el segundo día de

vida hasta el día del sacrificio (día 26), siendo sacrificadas bajo condiciones de alimentación y a primera hora de la mañana mediante la administración de CO₂, y siendo decapitadas posteriormente. En este momento, se recogió una muestra de sangre de las crías, así como muestras de tejido adiposo blanco inguinal, retroperitoneal, gonadal, tejido adiposo marrón, así como una muestra de hígado del animal y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis. Adicionalmente, en este momento se tomaron muestras de la glucemia de los ratones utilizando un sistema *Accu-Chek Aviva*.

3.3.Determinación de la expresión génica de los genes seleccionados mediante RT-PCR a tiempo real

Una vez seleccionados los genes de interés (*comentado en el apartado de Búsqueda bibliográfica*) se procedió al análisis de su expresión génica mediante RT-PCR a tiempo real (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*), la cual permite la detección y la medición de la expresión génica de un gen de interés combinando tres etapas básicas, la conversión del ARN en ADNc en la primera etapa de retrotranscripción, la amplificación del ADNc mediante PCR y su posterior cuantificación a tiempo real²⁹.

3.3.1. Extracción ARN

Para proceder en el análisis de la expresión génica de los genes de interés en primer lugar debe extraerse el ARN total de las muestras, para ello, se utilizó el Kit *mirVana TM miRNA Isolation Kit (Life Technologies)* que fue diseñado para la purificación de ARN en estudios que tuvieran como objetivo el análisis de siRNA y miRNA pero que es igual de válido para la extracción de ARN total y, que fue el seleccionado para agilizar el trabajo en el laboratorio y extraer el ARN de las muestras conjuntamente con una compañera.

Siguiendo el protocolo, se pesaron aproximadamente 25 mg iniciales (entre 15 y 25 mg) de hígado y se diluyeron en 10 volúmenes (1:10) por unidad de masa en *Lysis Binding Solution* (25 µL de muestras y 250 µL de *Solution*), homogenizando con un homogenizador. Las muestras se vortearon 30 segundos y fueron incubadas 5 minutos en hielo. Posteriormente, se añadieron 1/10 (55 µL) volúmenes de *miRNA Homogenate Additive* y fueron vorteadas durante otros 30 segundos y fueron incubadas 10 minutos en hielo. El siguiente paso consistió en añadir el mismo volumen de fenol/cloroformo que de lisado obtenido antes de añadir el *miRNA Homogenate Additive*, añadiendo así 250 µL de fenol/cloroformo. Seguidamente las muestras fueron vorteadas 1 minuto y centrifugadas 10 minutos a 10000g (4°C) para la separación de la fase acuosa y la fase orgánica. Esta fase acuosa superior se transfirió a un eppendorf nuevo, anotando el volumen recogido (200 µL en todas las muestras) y se añadieron 1.25 volúmenes

de etanol 100% a temperatura ambiente de este volumen (250 μL de etanol 100%), mezclando la dilución por inversión.

En este punto, se colocaron las columnas de extracción de ARN en los tubos colectores y se pasó el volumen del eppendorf con la fase acuosa y etanol, centrifugando las columnas 30 segundos a 10000g, descartando el eluido y repitiendo hasta que toda la mezcla de lisado y etanol hubiera pasado por el filtro. Seguidamente, se lavó la columna con 200 μL de *miRNA Wash Solution 1* y se centrifugaron los tubos 10 segundos a 10000g, descartando el eluido. La columna se siguió lavando dos veces con 500 μL de *Wash Buffer Solution 2/3*, centrifugando 10 segundos a 10000g. Finalmente, se dio una centrifugación rápida para eliminar los restos del filtro y se transfirió a la columna a un nuevo tubo colector, añadiendo 50 μL de agua libre de RNAsas a 95 °C e incubando 2 minutos. Se centrifugaron las columnas 30 segundos a máxima velocidad, recogiendo el eluido final, que es donde se encuentra el ARN purificado, que fue puesto en hielo ya listo para su cuantificación.

3.3.2. Cuantificación ARN

Disponiendo del ARN purificado se cuantificó el ARN de las muestras mediante el espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* a 260 nm obteniendo una lectura de la concentración de ARN ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y de la ratio 260/280, que indica la pureza de la muestra y que no debería ser superior a 2. Posteriormente, se comprobó la integridad de las muestras con una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.3.3. RT

El proceso de retrotranscripción se llevó a cabo mediante el kit *iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio Rad)* que consta de un protocolo muy sencillo y sensible para una transcripción reversa cuantitativa previa a la PCR. Antes de proceder al protocolo del kit, teniendo en cuenta las concentraciones de ARN obtenidas por cada muestra en la etapa anterior (cuantificación mediante *NanoDrop*), se hicieron diluciones de las muestras para tener una concentración final de 50 ng/ μL en todas las muestras, corroborando así que las diferencias de expresión génica que se puedan ver en la PCR sean causadas exclusivamente por diferencias entre la expresión y no por diferencias en la concentración de ARN de las muestras. Estas diluciones fueron comprobadas posteriormente con el espectrofotómetro *NanoDrop*.

Al tener las concentraciones de todas las muestras igualadas a 50 ng/ μL , se procedió a preparar la mix para la RT que consta, para una muestra, de 4 μL de 5x *iScript Reaction Mix*, 1 μL de Transcriptasa Reversa *iScript* y 10 μL de agua libre de RNAsas. En una placa de 96 pocillos

se cargaron 15 μL de la mix RT y 5 μL de cada muestra (o agua para la realización de un blanco de RT).

La preparación fue incubada en un termociclador (*Thermo Cycler 2720, Applied Biosystems*) 5 minutos a 25°C, 20 minutos a 46 °C, 1 minuto a 95°C y mantenidas en el tiempo a 4°C, según indica el protocolo de la casa comercial.

3.3.4. PCR

Para proceder con la PCR se prepararon inicialmente diluciones 1/10 del producto de la retrotranscripción (2 μL del producto RT + 18 μL agua libre de RNAsas), de estas diluciones resultantes se pipetearon 2 μL en cada pocillo de la placa. Asimismo, se reconstituyeron los cebadores que se tenían en stock en el laboratorio para obtener una concentración 5uM de todos ellos, a excepción de los cebadores para Cyp26a1 que se prepararon a 10 uM ya que por experiencia previa del laboratorio es un gen que tarda en amplificar. Los cebadores estaban en una concentración 200 uM, así que se pipetearon 5 μL del cebador y 195 μL de agua libre de RNAsas, exceptuando de los cebadores para Tnfa que al estar a 100 uM se reconstituyeron 5 μL en 95 μL de agua y, para preparar los cebadores de Cyp26a1, tal y como se ha comentado, se pipetearon 10 μL de cebador y en 190 μL de agua. Prosiguiendo con la técnica, se pipetearon 9 μL de la mix de PCR para cada gen, cuya composición es: 5 μL de *Power Sybr Green*, 0,45 μL de cada cebador, (Forward y Reverse a 5 uM, o 10 uM) y 3,1 μL de agua libre de RNAsas. A continuación, se pipetearon 2 μL de cada muestra (o de agua en el caso del blanco de PCR o el blanco de RT). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (*StepOnePlusTM Real-Time PCR System*) siguiendo las condiciones de reacción: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguidos de 1 minuto a 60°C y, finalmente un ciclo de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C y 15 segundos a 95°C.

3.3.5. Análisis de la expresión génica

La identificación de fragmentos amplificados de ADN concretos es posible a la presencia de SYBR Green añadido a la *mix* de la PCR ya que se une al ADN que se está sintetizando, emitiendo así fluorescencia y permitiéndola monitorear continuamente. La identificación de los fragmentos amplificados de ADN concretos se consigue mediante la temperatura de *melting* (T_m , temperatura de fusión) que es específica para el fragmento amplificado y cuyos resultados se obtienen a partir de la observación de la curva de *melting* en el programa informático *StepOne Plus Software v2.2.2* De este modo, se puede realizar la cuantificación de la expresión génica en términos relativos teniendo en cuenta el ciclo umbral (CT, *Cycle Threshold*) de las muestras

en la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de *Livak y Schmittgen*³⁰. Esta expresión relativa de ARNm para cada muestra y grupo experimental se calculó en forma de porcentaje respecto a la expresión de las muestras del grupo control (CO) referenciado como el 100%. Además, las muestras se normalizaron con el gen constitutivo 18S proporcionado por el laboratorio, que se mantiene invariable a las condiciones del estudio y por tanto es útil como un patrón interno.

3.4. Determinación de triglicéridos en hígado

La cuantificación de triglicéridos hepáticos se llevó a cabo mediante el kit “Triglicéridos líquidos” de *Química Clínica Aplicada S.A.* que se encarga de hidrolizar enzimáticamente los triglicéridos presentes en la muestra por acción de lipasas, tal y como se muestra en la reacción que se detalla a continuación, dando lugar a glicerol y ácidos grasos, que en presencia de glicerol quinasa (GK), el ATP cede un grupo fosforilo al glicerol para dar glicerol-3-fosfato y ADP. Estos productos, mediante la acción de la glicerolfosfato oxidasa (GPO) a dihidroxiacetona-fosfato y peróxido de hidrógeno, el cual, reacciona con 4-aminoantipirina y 4-clorofenol dando lugar a una quinoneimina que genera color, siendo este último proporcional a la concentración de triglicéridos en la muestra utilizando un espectrofotómetro:

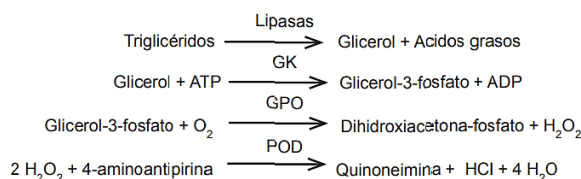


Figura 4. Principio del método (obtenido del protocolo comercial).

Siguiendo el protocolo aportado por la casa comercial se homogenizaron 20 mg de hígado (entre 17 y 23 mg) en 380 μL de PBS. Paralelamente, se prepararon las diluciones correspondientes para la elaboración de una recta patrón a partir del duplicado de 6 puntos de patrón con 0, 20, 40, 60, 80 o 100 μL de estándar (ST), aportado por la casa comercial con una concentración conocida de 200 mg/dL, añadiendo un volumen correspondiente de tampón fosfato salino (PBS) hasta obtener un volumen final de 100 μL (100, 80, 60, 20 y 0 μL de PBS, respectivamente) en cada estándar. Se pipetearon 10 μL de muestra o de los doce puntos totales de estándar en cada pocillo de la placa y, seguidamente se añadieron 250 μL de reactivo proporcionado por la casa comercial (Tampón Pipes pH 6,8, 4-clorofenol, 4-aminoantipirina, ATP, Aspartato, Glicerol-quinasa, Glicerol-3-fosfato oxidasa, peroxidasa, lipasas y estabilizantes no reactivos, en concentraciones que pueden ser consultadas en el protocolo de la casa comercial) en todos los pocillos, así como en 2 puntos de blanco. Se mezcló bien la preparación y fue incubada 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación se procedió a la lectura mediante

espectrofotómetro a 546 nm permitiendo así el cálculo de una recta patrón para determinar la cantidad de triglicéridos por peso de muestra.

3.5. Análisis estadístico de los datos

El análisis de los datos fue llevado a cabo con el programa estadístico *SPSS statistics* versión 22 (*IBM*). La distribución de los grupos se ha comparado con la prueba *Kruskal-Wallis* (que es la alternativa no paramétrica al test ANOVA de una vía) con la posterior corrección ajustada de Bonferroni para varias pruebas. Se trata de un test que permite la comparación de las distribuciones de los grupos en n pequeñas y no requiere que las muestras sigan una distribución normal. El presente test no paramétrico permite la representación gráfica mediante un *boxplot* de los cuartiles Q1, Q2 y Q3, y los valores mínimo y máximo de los datos. El umbral de significación se definió en $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Análisis de la composición corporal

El peso corporal de las crías y la cantidad de masa grasa y masa magra determinados el día 24 después del nacimiento se muestran en la *Figura 5*. Se puede observar que una HFHS (o *Western diet*) durante la gestación y la lactancia incrementa el peso (A), asociado a un incremento de la masa grasa (B) más que la masa magra (C) de las crías ($p < 0,05$, *K-W test ajustada por la corrección de Bonferroni*) y, los tratamientos aparentemente no tienen un efecto significativo sobre estos dos factores.

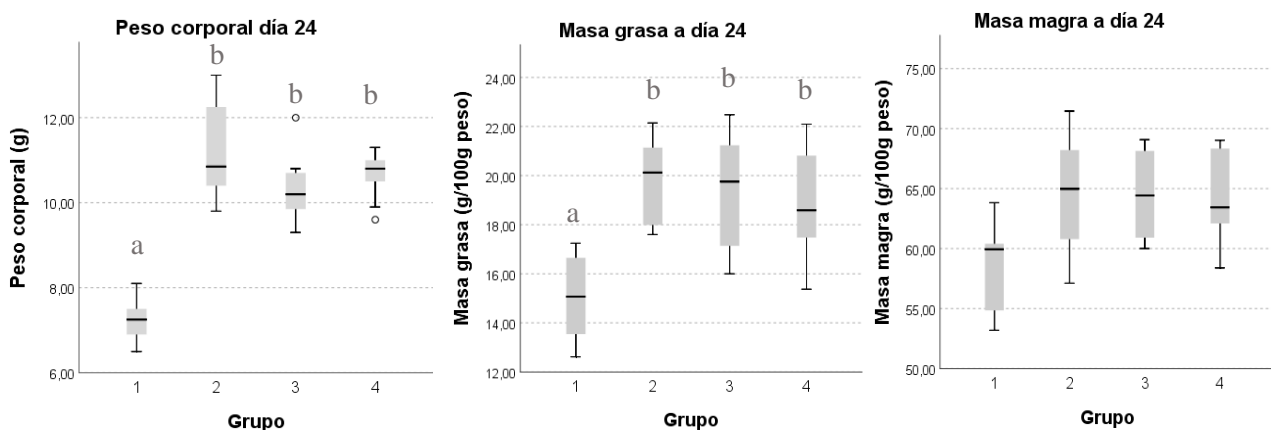


Figura 5A, B, C (respectivamente). Datos del análisis de la composición corporal el día 24 sin distinción entre sexos. Se representan verticalmente los cuartiles Q1, Q2 y Q3, y los valores mínimo y máximo de los datos los cuatro grupos. Grupos: 1: CO, 2: WD, 3: WD+RP, 4: WD+BC. *Estadística:* prueba *Kruskal-Wallis* y comparación por parejas ajustada mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas. Los grupos que no comparten una letra común (a, b) son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Símbolos: \circ 2DS (desviación estándar).

Asimismo, el peso de los animales a día 26 muestra la misma tendencia que el día 24. Adicionalmente, la dieta HFHS durante la gestación y lactancia incrementa la glucosa sanguínea de las crías en estado alimentado ($p < 0,05$, *K-W test ajustada por la corrección de Bonferroni*) (*Figura 6A, B*).

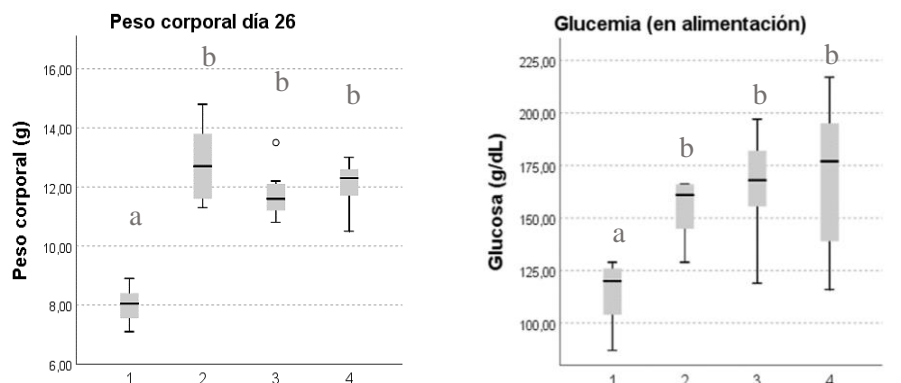


Figura 6A, B (respectivamente). Peso corporal de los animales y glucosa sanguínea el día 26 sin distinción entre sexos. Se representan verticalmente los cuartiles Q1, Q2 y Q3, y los valores mínimo y máximo de los datos (*boxplots*) de los cuatro grupos. Grupos: 1: CO, 2: WD, 3: WD+RP, 4: WD+BC. *Estadística:* prueba *Kruskal-Wallis* y comparación por parejas ajustada mediante la corrección de

Bonferroni para varias pruebas. Los grupos que no comparten una letra común (a, b) son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Símbolos: \circ 2DS (desviación estándar).

La adiposidad de las crías (calculada como la suma del peso de los depósitos adiposos blancos inguinal, retroperitoneal y gonadal respecto al peso corporal), así como la ratio grasa subcutánea/grasa visceral (calculado como la ratio entre el peso del depósito inguinal respecto al peso del retroperitoneal más el gonadal) se presentan en la *Figura 7*. Se observa que la dieta HFHS en la etapa perinatal aumenta la adiposidad de las crías (A) y promueve la acumulación de tejido adiposo en la cavidad visceral (B) ($p < 0,05$, *K-W test ajustada por la corrección de Bonferroni*). Ninguno de los tratamientos aparentemente tiene efectos en estos parámetros, no obstante, al analizar el depósito retroperitoneal (RT) se observa que el tratamiento con β -caroteno reduce la acumulación de grasa en este depósito (C).

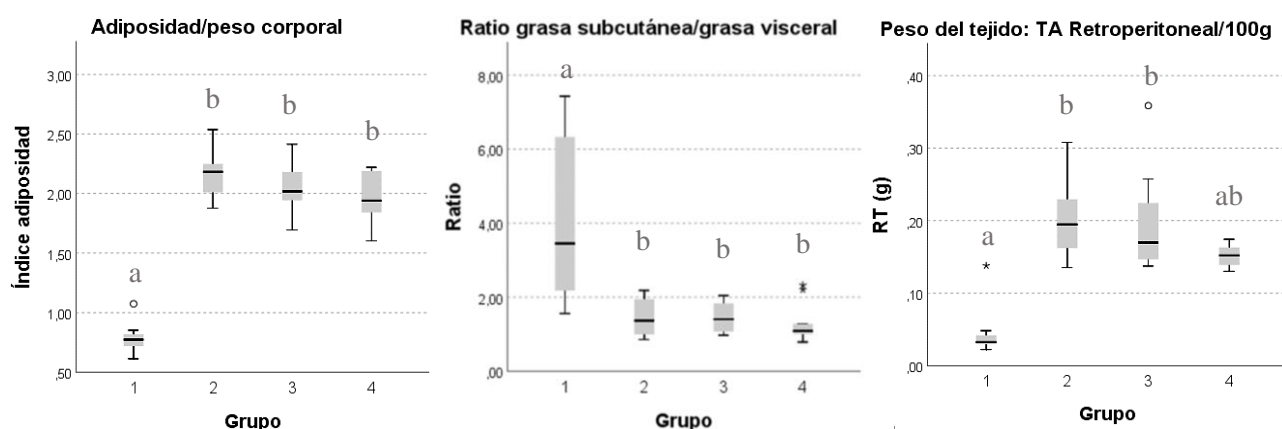


Figura 7A, B, C (respectivamente). Datos obtenidos el día 26 sin distinción entre sexos. Se representan verticalmente los cuartiles Q1, Q2 y Q3, y los valores mínimo y máximo de los datos (*boxplots*) de los cuatro grupos. Grupos: 1: CO, 2: WD, 3: WD+RP, 4: WD+BC. *Estadística*: prueba *Kruskall-Wallis* y comparación por parejas ajustada mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas. Los grupos que no comparten una letra común (a, b) son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Símbolos: \circ 2DS (desviación estándar) y * 3DS.

Mediante el análisis de los datos distinguiendo entre ambos sexos (macho o hembra) (*Figura 8 A, B, C*) se observa que el efecto reductor de la adiposidad del tratamiento con β -caroteno es especialmente evidente en machos ($p < 0,05$, *K-W test ajustada por la corrección de Bonferroni*) al observarse el efecto ya en el índice de adiposidad y los depósitos retroperitoneal y gonadal.

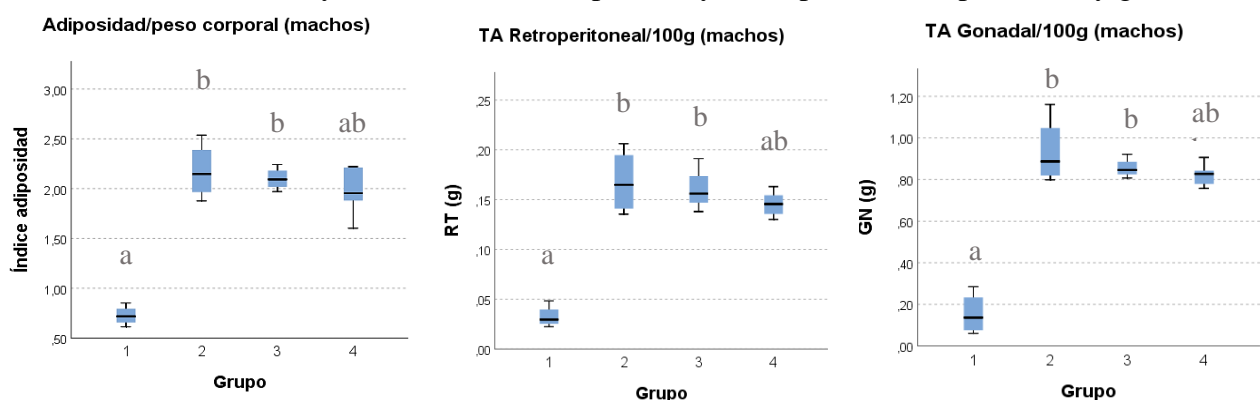


Figura 8A, B, C. (Respectivamente) Adiposidad y tejidos adiposos retroperitoneal y gonadal de los machos. Se representan verticalmente los cuartiles Q1, Q2 y Q3, y los valores mínimo y máximo de los datos (*boxplots*) de los cuatro grupos. Grupos: 1: CO, 2: WD, 3: WD+RP, 4: WD+BC. *Estadística:* prueba *Kruskall-Wallis* y comparación por parejas ajustada mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas. Los grupos que no comparten una letra común (a, b) son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

4.2. Análisis del estado hepático y expresión génica

Por otro lado, la dieta HFHS durante la gestación y lactancia tiene a incrementar el peso del hígado de los ratones (*Figura 9A*), asociado a un incremento del contenido de triglicéridos hepáticos (*Figura 9B*). Dicho efecto fue especialmente significativo con la suplementación con *retinyl* palmitato ya que aumenta significativamente el tamaño del hígado y, en machos, que muestran un aumento significativo de la cantidad de triglicéridos en el hígado (*Figura 9C*) ($p < 0,05$, *K-W test* ajustada por la corrección de Bonferroni).

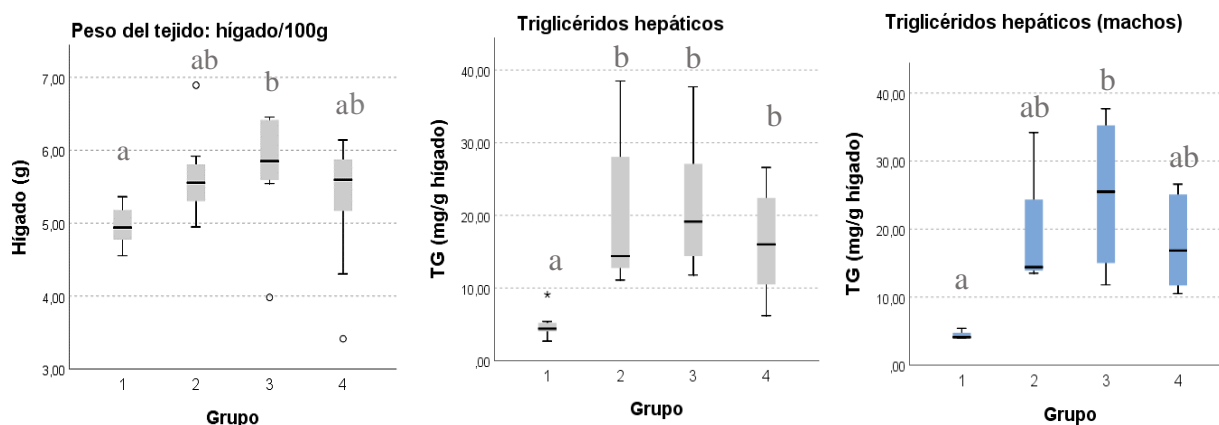


Figura 9A, B, C (respectivamente). Peso en ambos sexos y determinaciones en el hígado en machos. Se representan verticalmente los cuartiles Q1, Q2 y Q3, y los valores mínimo y máximo de los datos (*boxplots*) de los cuatro grupos. Grupos: 1: CO, 2: WD, 3: WD+RP, 4: WD+BC. *Estadística:* prueba *Kruskall-Wallis* y comparación por parejas ajustada mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas. Los grupos que no comparten una letra común (a, b) son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Símbolos: o 2DS (desviación estándar) y * 3DS.

Finalmente, la dieta HFHS en la gestación y la lactancia a los 26 días únicamente tiene efecto en la expresión génica de los genes estudiados (*indicados en el apartado de materiales y métodos*) en dos de los genes; *Cd36* y *Cox2*. A continuación (*Figura 10*) se muestran la distribución de las expresiones relativas de los mARNs calculadas respecto al promedio del grupo control (100%), se puede observar que la dieta materna tiende a disminuir la expresión génica de *Cd36* en el hígado; disminución que el tratamiento con β -caroteno hace significativamente (A) ($p < 0,05$, *K-W test* ajustada por la corrección de Bonferroni). Dicha tendencia se muestra claramente en machos. En cuanto a la expresión de *Cox2*, ambos

tratamientos atenúan la inducción de su expresión por la dieta HFHS, efecto más evidente en machos más que en hembras (*D*).

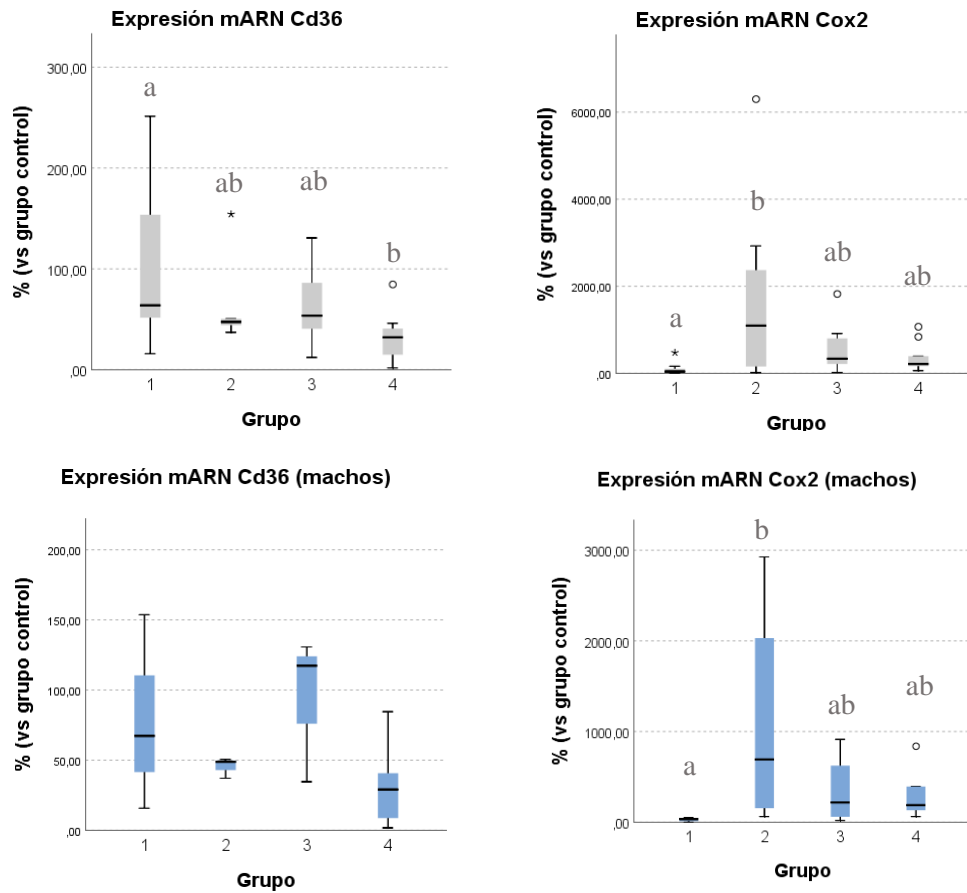


Figura 10A, B, C, D (respectivamente). Niveles de mARN en hígado. Se representan verticalmente los cuartiles Q1, Q2 y Q3, y los valores mínimo y máximo de los datos (*boxplots*) de los cuatro grupos. Grupos: 1: CO, 2: WD, 3: WD+RP, 4: WD+BC. *Estadística*: prueba *Kruskall-Wallis* y comparación por parejas ajustada mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas. Los grupos que no comparten una letra común (a, b) son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Símbolos: ○ 2DS (desviación estándar) y * 3DS.

5. Discusión de los resultados

El presente trabajo ha tenido como objetivo determinar los efectos de la suplementación con vitamina A durante la lactancia en las crías de ratón de madres alimentadas con una dieta HFHS en la etapa perinatal, la cual comprende la preconcepción, la gestación, la lactancia y un pequeño periodo de la etapa postnatal. Investigaciones anteriores han establecido que seguir una dieta rica en grasa y azúcar durante la gestación se relaciona con alteraciones en la descendencia, lo que actualmente se conoce como programación metabólica¹, y que, según numerosos estudios, estos efectos pueden ser modulados por la suplementación temprana con compuestos bioactivos en la leche materna^{31,32}. En un estudio reciente se identificó que la leche materna de ratas sometidas a restricción calórica durante la lactancia posee 29 metabolitos significativamente distintos al grupo control, además, algunos de estos metabolitos podrían estar involucrados en la programación metabólica de la descendencia confiriendo un fenotipo más saludable, indicando que intervenciones dietéticas en esta etapa pueden ser beneficiosas para la salud posterior de las crías¹⁶. Es por ello que los estudios que observan los efectos de la suplementación con compuestos bioactivos en la etapa de lactancia en crías de madres que han seguido una dietas obesogénicas en la etapa perinatal son de cada vez más frecuentes, a pesar que, todavía son escasos y se desconocen los mecanismos por los que estos compuestos podrían actuar^{31,32}. En este sentido, habiéndose establecido que la vitamina A (en sus formas dietéticas más comunes) es un compuesto que puede tener efectos sobre la programación metabólica de las crías adquirida por el entorno materno durante la lactancia^{22,24}, hasta el momento, no existen estudios que relacionen los efectos de la suplementación con esta vitamina en el contexto del efecto de dietas ricas en grasa y/o en azúcares en la etapa perinatal.

En primer lugar, los resultados de nuestro estudio muestran que la dieta HFHS durante la etapa perinatal aumenta el peso corporal, por tanto, del mismo modo que se ha visto en estudios recientes realizados en roedores^{6,33} lo que indica, tal y como se esperaba, que seguir una dieta obesogénica durante estas etapas tempranas tiene un efecto de programación metabólica con impacto en la salud de la descendencia. Cabe destacar, que en la investigación de Pomar *et al.*⁶ estas diferencias en el peso corporal se mostraron mantenidas en el tiempo hasta los 6 meses que duró la intervención, lo que podría indicar que la programación que confiere una dieta desequilibrada podría ser a medio-largo plazo. Adicionalmente, según nuestros resultados, aparentemente no se observa una tendencia en la que el tratamiento con vitamina A podría atenuar este efecto en el peso corporal, lo que ya se pudo ver en la investigación de Granados *et al.*, en la que el tratamiento con *retinyl* palmitato en la lactancia tampoco tuvo efectos en el

peso de los roedores²², además, en el estudio llevado a cabo por Musinovic *et al.* el tratamiento con β -caroteno tampoco tuvo estos efectos en la composición corporal²⁴.

Más allá del peso, la acumulación excesiva de grasa en el tejido adiposo y, en especial, el exceso de grasa en el área visceral o en zonas ectópicas (extrínsecas a este tejido) son factores que se relacionan con un mayor riesgo de alteraciones metabólicas que en conjunto pueden derivar en síndrome metabólico¹⁸. Además, recientemente se ha relacionado la contribución de la pérdida o falta de masa muscular en la salud global, sabiendo que un fenotipo saludable es el de un individuo con una relación masa grasa/masa magra en la que la masa magra sea la predominante³⁴. Por tanto, en cuanto a los datos de la composición corporal de las crías en el presente trabajo, la HFHS ha aumentado la masa grasa en las crías. Así que, en concordancia con lo observado en la bibliografía^{6,35-37}, se puede afirmar que la dieta rica en grasa materna confiere un fenotipo “obesogénico” a la descendencia y que existe una programación metabólica en este sentido. En línea con lo comentado, la dieta HFHS en la gestación y la lactancia también aumenta la adiposidad corporal y disminuye el ratio grasa subcutánea/grasa visceral de las crías, lo que también indica que la dieta materna rica en grasa predispone a las crías a un fenotipo poco saludable.

No obstante, en el análisis individual de los depósitos de tejido adiposo corporales se puede ver como el tratamiento con β -caroteno disminuye la acumulación de grasa en el tejido retroperitoneal y que, en machos, este tratamiento disminuye la adiposidad corporal y disminuye de manera más marcada la acumulación de grasa en esta zona, además de en el tejido adiposo gonadal. Por lo que, este tratamiento durante el período de lactancia atenúa el incremento de adiposidad, especialmente en el sexo masculino. No obstante, aunque en el trabajo de Musinovic *et al.*, no observaron diferencias entre los efectos de la suplementación en forma de β -caroteno en los distintos depósitos de tejido adiposo a corto plazo y en animales alimentados con una dieta estándar²⁴, nuestros datos muestran que el tratamiento con β -caroteno, parece mostrarse beneficioso en los efectos de la dieta HFHS a corto plazo (etapa perinatal) en cuanto a la adiposidad corporal. Este hecho concuerda con los resultados observados en ratones adultos de Amengual *et al.*³⁸, en los que la suplementación con β -caroteno tiene un impacto disminuyendo la adiposidad corporal, lo que se siguió estudiando en una intervención reciente³⁹, y fue revisado posteriormente por el mismo grupo de investigación¹⁸.

En cuanto a los efectos sobre el hígado, en nuestro estudio la HFHS en la etapa perinatal tiende a aumentar el peso del hígado, en concordancia con estudios previos en que una intervención similar realizada en ratas que recibieron una dieta grasa en la gestación y la lactancia³⁶ reafirmando que las condiciones nutricionales maternas durante estos periodos tienen un efecto sobre la salud de la descendencia. Asimismo, en el mismo estudio y en concordancia con nuestros datos, la glucosa circulante también es superior en la prole de las madres que han consumido HFHS en etapas perinatales³⁷, así pues, el efecto de la dieta materna, en este caso, podría asociarse con un mayor riesgo a padecer resistencia a la insulina a largo plazo, lo que evidencia una vez más que una dieta obesogénica durante la gestación y lactancia tiene implicaciones en alteraciones metabólicas en la descendencia. En el análisis del hígado, y coincidiendo con los datos anteriormente comentados que indican un aumento de adiposidad conferida por la dieta HFHS en etapas perinatales, se observa un incremento en el contenido de triglicéridos en el hígado de la prole. En estudios anteriores se ha observado que este tipo de dietas maternas promueven a la acumulación de triglicéridos en el hígado, ya que el hígado es el único órgano que se encarga de almacenar lípidos en la etapa fetal y, que, en esta etapa la oxidación lipídica aun no está plenamente desarrollada^{35,40,41}. Una acumulación excesiva de lípidos en el hígado en la edad adulta es un factor clave y característico en el desarrollo de enfermedades hepáticas como la enfermedad del hígado graso no alcohólico⁴², por lo que se podría afirmar que la dieta desequilibrada en macronutrientes en la etapa perinatal tiene una vez más influencia en la salud de la descendencia siendo susceptible a aumentar el riesgo de padecer alteraciones metabólicas más graves en un futuro. En nuestro trabajo el incremento de triglicéridos hepáticos inducido por la HFHS se muestra agravado por el tratamiento con *retinyl* palmitato, en machos, el cual también aumenta el peso del hígado por lo que parece acentuar esta malporgamación en el hígado, a pesar de que el ácido retinoico, según la bibliografía previa, se ha relacionado con una reducción de los triglicéridos hepáticos tanto *in vivo* como *in vitro* asociada a un aumento de la capacidad de la β -oxidación de los ácidos grasos en el hígado⁴³.

Además, la dieta HFHS en la etapa perinatal, generalmente, no ha tenido efectos en la expresión génica en el hígado de la descendencia de los genes seleccionados a excepción del gen mitocondrial Cox2 (Citocromo c oxidasa subunidad 2 componente del complejo IV de la cadena respiratoria de electrones), en cuanto a que la dieta obesogénica materna ha aumentado su expresión en el hígado y ambos tratamientos han mostrado atenuar este aumento, viéndose que este efecto es más significativo en machos que en hembras. Este gen es un marcador de la

capacidad oxidativa mitocondrial por lo que su expresión aumentada en el hígado después de seguir una HFHS se asocia a la estimulación de la β -oxidación lipídica mitocondrial para contrarrestar el exceso de aporte energético⁴⁴, su reducción se podría relacionar con desórdenes en la oxidación de este exceso de lípidos y lo que en consecuencia da lugar a una acumulación de triglicéridos en este tejido⁴⁴. Por tanto, en conjunto parece ser que ambos tratamientos, con *retinyl* palmitato y β -caroteno en machos, disminuyen la capacidad oxidativa en las mitocondrias en los hepatocitos, lo que se puede traducir en una tendencia a la acumulación de lípidos, y, lo que va en concordancia con los resultados que ya se han comentado anteriormente, en los que se observa que este tratamiento, sobre todo en machos, da lugar a un mayor contenido de triglicéridos en el hígado y, también aumenta el peso del tejido. Finalmente, el tratamiento con *retinyl* palmitato también se relaciona con el mantenimiento en la expresión hepática del gen Cd36 (*Cluster determinant 36*), el cual está implicado en el transporte de lípidos y en la captación las lipoproteínas que los transportan (como las LDL, o lipoproteínas de baja densidad)⁴⁵, por lo que, su activación en el hígado podría condicionar un aumento en la captación hepática de lípidos que si se combina con una disminución en la capacidad oxidativa en las mitocondrias hepáticas daría lugar a la acumulación de triglicéridos en el hígado⁴⁶, como podría haber ocurrido con el tratamiento con *retinyl* palmitato. Por tanto, la acumulación de triglicéridos hepáticos que es visible en machos suplementados con un exceso moderado de vitamina A en forma de *retinyl* palmitato podría deberse a este mantenimiento en la capacidad transportadora combinada con la disminución en la capacidad oxidativa mitocondrial que también se le asocia (visto en Cox2). Por lo que, el presente estudio podría servir como una primera aproximación para futuras investigaciones en las que se estudien los mecanismos por los cuales en machos la suplementación de vitamina A en forma de *retinyl* palmitato tiene este impacto en el hígado, ya que se necesitaría más investigación para poder esclarecer la influencia del sexo en estos aspectos. Además, la presente investigación podría servir de precedente para posibles investigaciones futuras en las que se estudien los efectos de la suplementación con ambas formas de vitamina A con un estudio de la expresión génica más exhaustivo, tanto a corto como a largo plazo.

En resumen, se necesita más investigación para estudiar los efectos en la edad adulta de los efectos observados en el tejido adiposo y la acumulación de triglicéridos. Los resultados podrían tener implicaciones para la pandemia de obesidad y, en particular, para la obesidad infantil, ya que el contenido de vitamina A de la leche humana está relacionado con el estado y la ingesta materna de vitamina A durante la lactancia.

6. Conclusiones

1. Una dieta materna desequilibrada durante la periconcepción, gestación y amamantamiento incrementa el peso corporal y la glucemia (en estado de alimentación) asociado al incremento de la adiposidad corporal y los triglicéridos hepáticos en la descendencia a corto plazo.
2. Un exceso moderado de vitamina A, en forma de β -caroteno, durante el período de lactancia atenúa el incremento de la adiposidad corporal especialmente en machos y en los depósitos adiposos retroperitoneal y gonadal.
3. Un exceso moderado de vitamina A, en forma de *retinyl* palmitato o β -caroteno, durante el período de lactancia no atenúa la acumulación de triglicéridos en el hígado. En machos suplementados con un exceso moderado de *retinyl* palmitato durante el período de lactancia, más bien se observa una mayor acumulación de los triglicéridos hepáticos asociado al mantenimiento de la capacidad de captación de lípidos (Cd36) y a una disminución de la capacidad oxidativa de las mitocondrias (Cox2).

7. Referencias bibliográficas

1. Picó, C., Reis, F., Egas, C., Mathias, P. & Matafome, P. Lactation as a programming window for metabolic syndrome. *Eur. J. Clin. Invest.* **51**, (2021).
2. Barker, D. J. P. Fetal origins of coronary heart disease. *Br. Heart J.* **69**, 195 (1993).
3. Barker, D. J. P. & Thornburg, K. L. The obstetric origins of health for a lifetime. *Clin. Obstet. Gynecol.* **56**, 511–519 (2013).
4. De Souza Mesquita, L. M., Mennitti, L. V., De Rosso, V. V. & Pisani, L. P. The role of vitamin A and its pro-vitamin carotenoids in fetal and neonatal programming: gaps in knowledge and metabolic pathways. *Nutr. Rev.* **79**, 76–87 (2021).
5. Reynolds, C. M., Gray, C., Li, M., Segovia, S. A. & Vickers, M. H. Early Life Nutrition and Energy Balance Disorders in Offspring in Later Life. *Nutrients* **7**, 8090–8111 (2015).
6. Pomar, C. A. *et al.* Maternal consumption of a cafeteria diet during lactation in rats leads the offspring to a thin-outside-fat-inside phenotype. *Int. J. Obes.* 2017 418 **41**, 1279–1287 (2017).
7. Desai, M. *et al.* Rat Maternal Obesity and High Fat Diet Program Offspring Metabolic Syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **211**, 237.e1 (2014).
8. Sun, B. *et al.* Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. *Diabetes* **61**, 2833–2841 (2012).
9. Agnoux, A. M. *et al.* Time window-dependent effect of perinatal maternal protein restriction on insulin sensitivity and energy substrate oxidation in adult male offspring. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **307**, 184–197 (2014).
10. Yeruva, L. *et al.* The Human Breast Milk Metabolome in Overweight and Obese Mothers. *Front. Immunol* **11**, 1533 (2020).
11. Vijayan, M. *et al.* Maternal Obesity: A Focus on Maternal Interventions to Improve Health of Offspring. *Front. Cardiovasc. Med.* **1**, 696812 (2021).
12. Panagos, P. G. *et al.* Breastmilk from obese mothers has pro-inflammatory properties and decreased neuroprotective factors. *J. Perinatol.* **36**, 284 (2016).
13. Bzikowska-Jura, A. *et al.* Maternal Nutrition and Body Composition During Breastfeeding: Association with Human Milk Composition. *Nutrients* **10**, (2018).
14. Ward, E. *et al.* Acute changes to breast milk composition following consumption of high-fat and high-sugar meals. *Matern. Child Nutr.* **17**, e13168 (2021).
15. Torrens, J. M. *et al.* Early biomarkers identified in a rat model of a healthier phenotype based on early postnatal dietary intervention may predict the response to an obesogenic environment in adulthood. *J. Nutr. Biochem.* **25**, 208–218 (2014).
16. 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).
17. Harrison, E. H. Carotenoids, β -Apocarotenoids, and Retinoids: The Long and the Short of It. *Nutrients* **14**, 1411 (2022).

18. Bonet, M. L., Ribot, J., Galmés, S., Serra, F. & Palou, A. Carotenoids and carotenoid conversion products in adipose tissue biology and obesity: Pre-clinical and human studies. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1865**, 158676 (2020).
19. Albalat, R. The retinoic acid machinery in invertebrates: Ancestral elements and vertebrate innovations. *Mol. Cell. Endocrinol.* **313**, 23–35 (2009).
20. Saeed, A., Dullaart, R. P. F., Schreuder, T. C. M. A., Blokzijl, H. & Faber, K. N. Disturbed Vitamin A Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Nutrients* **10**, 29 (2018).
21. Blaner, W. S. Vitamin A Signaling and Homeostasis in Obesity, Diabetes, and Metabolic Disorders. *Pharmacol Ther* **197**, 153–178 (2019).
22. Granados, N. *et al.* Vitamin A supplementation in early life affects later response to an obesogenic diet in rats. *Int. J. Obes.* **37**, 1169–1176 (2013).
23. Bonet, M. L., Canas, J. A., Ribot, J. & Palou, A. Carotenoids in adipose tissue biology and obesity. *Subcell. Biochem.* **79**, 377–414 (2016).
24. Mušinić, H. *et al.* β -Carotene during the suckling period is absorbed intact and induces retinoic acid dependent responses similar to preformed vitamin A in intestine and liver, but not adipose tissue of young rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **58**, 2157–2165 (2014).
25. Arreguín, A. *et al.* Dietary vitamin A impacts DNA methylation patterns of adipogenesis-related genes in suckling rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **650**, 75–84 (2018).
26. Chu, D. T., Malinowska, E., Jura, M. & Kozak, L. P. C57BL/6J mice as a polygenic developmental model of diet-induced obesity. *Physiol. Rep.* **5**, (2017).
27. O’Byrne, S. M. *et al.* Multiple pathways ensure retinoid delivery to milk: studies in genetically modified mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, (2010).
28. Rath, E. A. & Thenen, S. W. Use of Tritiated Water for Measurement of 24-Hour Milk Intake in Suckling Lean and Genetically Obese (ob/ob) Mice. *J. Nutr.* **109**, 840–847 (1979).
29. Nolan, T., Hands, R. E. & Bustin, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* **1**, 1559–1582 (2006).
30. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
31. Senkus, K. E., Zhang, Y., Wang, H., Tan, L. & Crowe-White, K. M. Lycopene supplementation of maternal and weanling high-fat diets influences adipose tissue development and metabolic outcomes of Sprague-Dawley offspring. *J. Nutr. Sci.* **10**, 1–10 (2021).
32. Liu, T. Y. *et al.* Resveratrol intake during pregnancy and lactation re-programs adiposity and ameliorates leptin resistance in male progeny induced by maternal high-fat/high sucrose plus postnatal high-fat/high sucrose diets via fat metabolism regulation. *Lipids Health Dis.* **19**, (2020).
33. Wankhade, U. D. *et al.* Enhanced offspring predisposition to steatohepatitis with maternal high-fat diet is associated with epigenetic and microbiome alterations. *PLoS One* **12**, 1–21 (2017).

34. Kim, G. *et al.* Increase in relative skeletal muscle mass over time and its inverse association with metabolic syndrome development: A 7-year retrospective cohort study. *Cardiovasc. Diabetol.* **17**, 1–13 (2018).
35. Huang, Y. *et al.* Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation affects hepatic lipid metabolism in early life of offspring rat. *J. Biosci.* **42**, 311–319 (2017).
36. Ohta, T. *et al.* Maternal high-fat diet promotes onset of diabetes in rat offspring. *Anim. Sci. J.* **88**, 149–155 (2017).
37. Rajia, S., Chen, H. & Morris, M. J. Maternal Overnutrition Impacts Offspring Adiposity and Brain Appetite Markers-Modulation by Postweaning Diet. *J. Neuroendocrinol.* **22**, 905–914 (2010).
38. Amengual, J. *et al.* Beta-Carotene Reduces Body Adiposity of Mice via BCMO1. *PLoS One* **6**, 20644 (2011).
39. Stojnić, B. *et al.* Protective Effects of Individual and Combined Low Dose Beta-Carotene and Metformin Treatments against High-Fat Diet-Induced Responses in Mice. *Nutrients* **13**, (2021).
40. Oxford, J. & Hughes, A. A lipid-rich gestational diet predisposes offspring to nonalcoholic fatty liver disease: a potential sequence of events. *Hepatic Med. Evid. Res.* **4**, 15–23 (2014).
41. Ashino, N. G. *et al.* Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 341–348 (2012).
42. Thompson, M. D. Developmental Programming of NAFLD by Parental Obesity. *Rev. / Hepatol. Commun.* **4**, 2020 (2020).
43. Melis, M., Tang, X.-H., Trasino, S. E. & Gudas, L. J. Retinoids in the Pathogenesis and Treatment of Liver Diseases. *Nutrients* **14**, 1456 (2022).
44. Zou, X. *et al.* Mitochondrial Dysfunction in Obesity-Associated Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Protective Effects of Pomegranate with Its Active Component Punicalagin. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 1557–1570 (2014).
45. Zhao, L., Varghese, Z., Moorhead, J. F., Chen, Y. & Ruan, X. Z. CD36 and lipid metabolism in the evolution of atherosclerosis. *Br. Med. Bull.* **126**, 101–112 (2018).
46. Rada, P., González-Rodríguez, Á., García-Monzón, C. & Valverde, Á. M. Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver? *Cell Death Dis.* **11**, (2020).