



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

El impacto del sobrepeso materno en el metabolismo lipídico de la madre y la placenta, y la programación de hígado graso en la descendencia de rata. Posible efecto protector del butirato.

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. María Florencia Heinecke

Directora de tesis: Dra. Verónica White

Consejero de Estudios: Dra. Fabiana L. Lo Nostro

Lugar de trabajo: Laboratorio de Programación de Anomalías Metabólicas, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET-UBA), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2025

“El impacto del sobrepeso materno en el metabolismo lipídico de la madre y la placenta, y la programación de hígado graso en la descendencia de rata. Posible efecto protector del butirato”.

Resumen:

La obesidad y el sobrepeso constituyen una creciente epidemia global. Los hijos de madres con sobrepeso u obesidad tienen mayor predisposición a desarrollar obesidad, diabetes tipo 2 e hígado graso. Estudios previos de nuestro laboratorio, han mostrado anomalías hepáticas e intestinales en la descendencia de madres con sobrepeso, asociadas con un fenotipo similar al hígado graso.

En los últimos años ha cobrado relevancia la microbiota intestinal y su incidencia en la homeostasis metabólica, y por ello las alteraciones en su composición se asocian al desarrollo de patologías metabólicas. El butirato, derivado de la fermentación de la fibra en el intestino, posee propiedades antiinflamatorias y mantiene la homeostasis intestinal.

En este trabajo de tesis, utilizando un modelo de sobrepeso materno en rata hemos encontrado acumulación lipídica y alteraciones hepáticas, incrementos en la trigliceridemia y actividad transaminasa plasmática, así como incrementos en el porcentaje de masa adiposa, tanto en las madres gestantes a término como en sus fetos. Estos indicadores del desarrollo de hígado graso persistieron en las madres post lactancia y en las crías adultas de 140 días alimentadas con dieta normograsa a partir del destete.

El tratamiento materno durante la gestación y lactancia con Butirato logró prevenir la mayoría de las anomalías encontradas en los fetos y la descendencia. En las madres, el efecto del tratamiento no fue tan contundente, aunque se observaron mejorías en los parámetros en circulación y la masa adiposa.

Nuestro trabajo no sólo remarca la importancia del entorno materno, sino también la posibilidad de mejorar el programa metabólico de la descendencia desde la vida intrauterina utilizando un tratamiento materno no invasivo.

Palabras claves: Programación intrauterina – Sobrepeso materno – Butirato – Hígado – Placenta – Metabolismo lipídico

“The impact of maternal overweight on the lipid metabolism of the mother, the placenta, and the programming of fatty liver in the offspring from rats. Possible protective effect of butyrate”.

Abstract:

Obesity and overweight are a growing global epidemic. Offspring of overweight or obese mothers are more likely to develop obesity, type 2 diabetes and fatty liver disease. Previous studies from our laboratory have shown liver and intestinal abnormalities in the offspring of overweight mothers associated with a fatty liver-like phenotype. In recent years, the intestinal microbiota and its impact on metabolic homeostasis has gained relevance and, therefore, alterations in its composition are associated with the development of metabolic pathologies. Butyrate, derived from the fermentation of fibre in the intestine, has anti-inflammatory properties and maintains intestinal homeostasis.

In this thesis, using a rat model of maternal overweight, we have found lipid accumulation and hepatic alterations, increases in triglyceridaemia and plasma transaminase activity, as well as increases in the percentage of adipose mass, both in pregnant mothers at term and in their fetuses. These indicators of fatty liver development persisted in the post-lactation mothers and in the 140-day-old adult offspring fed a diet with normal content of fat from weaning onwards.

Maternal treatment during gestation and lactation with butyrate prevented most of the abnormalities found in fetuses and offspring. In the mothers, the effect of treatment was not as strong, although improvements in circulating parameters and adipose mass were observed.

Our work not only highlights the importance of the maternal environment, but also the possibility of improving the metabolic programme of the offspring from intrauterine life using a non-invasive maternal treatment.

Keywords: Intrauterine programming - Maternal overweight - Butyrate - Liver - Placenta - Lipid metabolism - Maternal overweight - Liver - Lipid metabolism.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	12
SOBREPESO Y OBESIDAD	13
<i>Obesidad y metabolismo</i>	18
<i>Obesidad e inflamación</i>	19
<i>Obesidad y gestación</i>	21
PROGRAMACIÓN METABÓLICA	23
EL HÍGADO	26
<i>Metabolismo hepático de ácidos grasos</i>	28
<i>Incorporación de ácidos grasos en el hígado</i>	30
<i>Lipogénesis y su regulación</i>	31
β-Oxidación de Ácidos Grasos	33
<i>Almacenamiento de lípidos</i>	34
<i>Enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA)</i>	36
<i>Programación de hígado graso</i>	37
PLACENTA	39
<i>Placenta y programación metabólica.</i>	43
<i>Metabolismo placentario de ácidos grasos.</i>	44
<i>Tráfico de ácidos grasos en la placenta</i>	44
<i>Almacenamiento de lípidos</i>	45
β-oxidación de ácidos grasos	46
<i>Placenta e inflamación</i>	47
<i>Dimorfismo sexual</i>	48
MICROBIOTA INTESTINAL Y ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA (AGCC).....	50
<i>El butirato</i>	51
<i>Absorción del butirato</i>	53
<i>Mecanismo de acción del butirato</i>	54
<i>Rol del butirato en el metabolismo hepático, la obesidad y la gestación</i>	55
ANTECEDENTES	58
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	59
HIPÓTESIS.....	60
OBJETIVO GENERAL	60
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
3.METODOLOGÍA	63

3.1 Animales.	64
3.1.1 Modelo de sobrepeso materno: diseño experimental.	64
<i>Diseño experimental modelo gestacional.</i>	64
<i>Obtención de los tejidos maternos y fetales al día 21 de gestación.</i>	66
<i>Diseño experimental modelo programación.</i>	67
<i>Obtención de los tejidos maternos al destete.</i>	68
<i>Obtención de los tejidos de la descendencia a los 140 días de edad.</i>	68
3.2 Parámetros reproductivos.	70
3.3 Análisis bioquímicos en suero materno y plasma fetal y de la descendencia de 140 días de edad.	72
3.4 Determinación de proteínas.....	74
3.5 Determinación del contenido lipídico en placentas e hígados mediante cromatografía en capa delgada (TLC).....	75
<i>Extracción lipídica.</i>	75
<i>Cromatografía en capa delgada (TLC).</i>	76
3.6 Determinación de niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo de lípidos.	77
<i>Extracción de ARN.</i>	77
<i>Síntesis de ADN complementario.</i>	78
<i>Amplificación.</i>	78
3.7 Determinación de niveles proteicos mediante Western blot.	81
3.8 Lipoperoxidación, ensayo TBARS.	84
3.9 Análisis estadístico.	84
4. RESULTADOS.....	86
PARTE A: Modelo gestacional.....	88
CAPÍTULO 1: Efecto del sobrepeso materno por una dieta rica en grasas saturadas.	
Caracterización del modelo dietario y tratamiento con butirato durante la gestación.....	88
<i>Peso materno previo a la gestación.</i>	89
<i>Tratamiento con butirato durante la gestación.</i>	90
<i>Ganancia de peso durante la gestación. Parámetros maternos al día 21 de gestación.</i> 90	
<i>Parámetros plasmáticos en la madre al día 21 de gestación. Glucemia, trigliceridemia y colesterolemia.</i>	92
<i>Parámetros fetales al día 21 de gestación.</i>	94
Conclusiones Capítulo 1:	96
CAPÍTULO 2: Efecto del sobrepeso materno y del tratamiento con butirato durante la gestación en el hígado materno al día 21 de gestación.....	97
<i>Contenido lipídico en el hígado de las madres al día 21 de gestación.</i>	97

<i>Niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo lipídico en el hígado materno al día 21 de gestación.</i>	98
Conclusiones capítulo 2:	102
CAPÍTULO 3: Efecto del sobrepeso materno y del tratamiento con butirato durante la gestación en las placentas al día 21 de gestación.	103
<i>Contenido lipídico en las placentas al día 21 de gestación.</i>	103
<i>Niveles de proteínas involucradas en el metabolismo lipídico en placentas al día 21 de gestación.</i>	105
<i>Niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo lipídico en placentas de ratas al día 21 de gestación.</i>	108
Conclusiones capítulo 3:	114
CAPÍTULO 4: Efecto del sobrepeso materno y del tratamiento con butirato durante la gestación en los fetos de día 21 de gestación.	115
<i>Parámetros plasmáticos fetales al día 21 de gestación. Colesterolemia, trigliceridemia y glucemia.</i>	115
<i>Parámetros plasmáticos fetales al día 21 de gestación. Enzimas hepáticas.</i>	117
<i>Contenido lipídico en los hígados fetales al día 21 de gestación.</i>	117
<i>Niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo lipídico en los hígados fetales al día 21 de gestación.</i>	119
Conclusiones capítulo 4:	125
PARTE B: Modelo de programación	126
CAPÍTULO 5: Efecto del sobrepeso materno por una dieta rica en grasas saturadas. Tratamiento con butirato durante la preñez y la lactancia. Caracterización de las madres al destete.	128
<i>Parámetros maternos al destete.</i>	128
<i>Parámetros séricos maternos al destete.</i>	129
<i>Efecto del sobrepeso materno y el tratamiento con butirato de sodio sobre la preñez y la lactancia en los hígados maternos al destete.</i>	132
<i>Contenido lipídico en los hígados de madres al destete.</i>	132
<i>Niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo lipídico en los hígados maternos al destete.</i>	134
<i>Lipoperoxidación tisular en los hígados de madres al destete.</i>	139
Conclusión Capítulo 5:.....	141
CAPÍTULO 6: Efecto del sobrepeso materno y del tratamiento con butirato durante la gestación y la lactancia en la descendencia de 140 días de edad. Caracterización, parámetros metabólicos, hepáticos y reproductivos.	142
<i>Parámetros plasmáticos en la descendencia a los 140 días de edad.</i>	144
<i>Contenido lipídico en los hígados de la descendencia de 140 días de edad.</i>	147
<i>Lipoperoxidación tisular en los hígados de la descendencia de 140 días de edad.</i>	150

<i>Niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo lipídico en los hígados de la descendencia de 140 días de edad.</i>	151
<i>Parámetros reproductivos.</i>	158
<i>Parámetros espermáticos.</i>	160
Conclusiones Capítulo 6:	162
5. DISCUSIÓN	163
6. CONCLUSIÓN	181
7. REFERENCIAS	186

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que formaron parte de este camino de aprendizaje, por su apoyo incondicional!

En primer lugar, a la Universidad de Buenos Aires, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por permitirme unirme a la carrera de doctorado, y a la Facultad de Medicina y el CEFyBO por darme lugar de trabajo en donde realizar mi tesis, con todo lo necesario.

A mi directora, la Dra. Verónica White, por enseñarme todo con amor y pasión por la ciencia, y por permitirme investigar libremente todos estos años.

A Ali J., Eva, Romi, Dai, Dal, Sabri, Hugo y Cin, del Laboratorio de Reproducción y Metabolismo, con quienes compartí lugar de trabajo los primeros años, por su tiempo, su ayuda y por todos los mates, viajes, llantos y risas compartidos.

A Ali F., Ro, Agus, Jere y Dani del Laboratorio de Endocrinología Reproductiva, por recibirnos con los brazos abiertos y por el aprendizaje diario.

A Vero, Jere, Dani, Mari y Vicky, con quienes formamos el Laboratorio de Programación de Anomalías Metabólicas, por compartir el día a día y aprender juntos. En especial a Jere, por su amistad, por los viajes compartidos y por sus mil días bancándome hasta tarde a que termine un experimento.

A todo el CEFyBO por cada seminario y reunión de becarios y por siempre estar predispuesto a dar una mano y ayudar con cualquier duda o equipo. En especial al personal técnico, Patricia M. Fernández, M. Alejandra Verón, M. Cristina Lincon, Alberto Capriolo, Daniela C. Néspola, Alcira Mazziotti y Vanesa Fernández, por su excelente asistencia diaria.

A Marcela Márquez y Enzo Cuba, los técnicos del bioterio, por su gran ayuda y enseñanza con el manejo de animales, siempre con paciencia y priorizando el bienestar animal.

A mis papas, por su apoyo incondicional y sus ojos de orgullo, por bancarme en todo momento y siempre decirme que sí puedo. A mis hermanos, abuelos, tíos, primos y toda mi familia por todo su amor y siempre estar ahí.

A Agos, Dolo, Majo y Sofi, mis facuamigas, por las charlas, los viajes y el tiempo compartido, son un gran apoyo emocional. En especial a Majo, con quien además compartí instituto, por su ayuda y amistad incondicional y a Dolo, con quién trabajé el último año, por entenderme tanto y apoyarme siempre.

A Agus, Cami y Meri, mis amigas de toda la vida, por apoyarme y escucharme hablar del laboratorio, aunque me dicen que no entienden mucho, y estar en todos los momentos de la vida.

A Fede, mi amor, por bancarme este último tiempo que la computadora era una extensión de mi cuerpo y ser un gran sostén.

¡GRACIAS!

ABREVIATURAS

4-HNE:	4-hidroxinonenal
ACAA2:	acetil-CoA aciltransferasa 2
ACC:	acetil-CoA carboxilasa
ACO:	acil-CoA oxidasa
ACSL:	acil-CoA sintasa de cadena larga
ADN:	ácido desoxirribonucleico
AGCC:	ácidos grasos de cadena corta
AGL:	ácidos grasos libres
AHR:	receptor de hidrocarburos aromáticos policíclicos
ALP:	fosfatasa alcalina
ALT:	alanina aminotransferasa
ANOVA:	análisis de la varianza
ARN:	ácido ribonucleico
AST:	aspartato aminotransferasa
ATP:	trifosfato de adenosina
BSA:	seroalbúmina bovina
cDNA:	ADN complementario
CPT-1:	palmitoil-carnitina transferasa 1
CYP4A1:	citocromo P450 4A subfamilia isoforma 1
DAG:	diacilglicerol
DAMP:	patrones moleculares asociados a daños
DOHaD:	hipótesis de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad
EHGNA:	enfermedad del hígado graso no alcohólico
eNOS:	óxido nítrico sintasa endotelial
ERK-1/2:	quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2
FABP:	proteínas de unión a ácidos grasos
FAS:	sintasa de ácidos grasos
FAT/CD36:	traslocasa de ácidos grasos
FATP:	proteínas transportadoras de ácidos grasos

FFAR2/ GPR43: receptores de ácidos grasos libres 2
FFAR3/ GPR41: receptores de ácidos grasos libres 3
GLP-1: péptido 1 similar al glucagón
GLUT4: transportador de glucosa 4
GPCR: receptores acoplados a proteína G
HADHA: hidroxiaxil-CoA deshidrogenasa trifuncional α
HDAC: histona deacetilasa
IL-18: interleuquina 18
IL-1 β : interleuquina 1 beta
IL-6: interleuquina 6
IMC: índice de masa corporal
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
IP3: inositol trifosfato
JNK: c-Jun cinasa terminal
LCAD: acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga
LCFA: ácidos grasos de cadena larga
LE/LIPG: lipasa endotelial/G
LH: lipasa hepática
LPL: lipoproteína lipasa
LPS: lipopolisacárido bacteriano
LXR- α : receptor hepático X alfa
MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos
MCT1/SLC16A1: transportador 1 de monocarboxilatos acoplado a protones
MDA: malondialdehído
NF- κ B: factor nuclear kappa B
NLRP3: receptor tipo NOD de la familia 3 que contiene un dominio pirina
OMS: Organización Mundial de la Salud
ON: óxido nítrico
PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos
PKC: proteína cinasa C

PLIN2: perilipina-2

PPAR- α : receptor alfa activado por proliferador de peroxisoma

PPAR- γ : receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma

PYY: péptido YY

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RNS: especies reactivas de nitrógeno

ROS: especies reactivas de oxígeno

SEM: error estándar medio

SMCT1/SLC5A8: transportador 1 de monocarboxilatos acoplado a sodio

SNC: sistema nervioso central

SOD2: superóxido dismutasa 2

SREBP-1c: proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1c

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

TJ: uniones estrechas

TLC: cromatografía en capa delgada

TLR4: receptor tipo Toll 4

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

Treg: células reguladoras T

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

ZO: zónula ocludens

1. INTRODUCCIÓN

SOBREPESO Y OBESIDAD

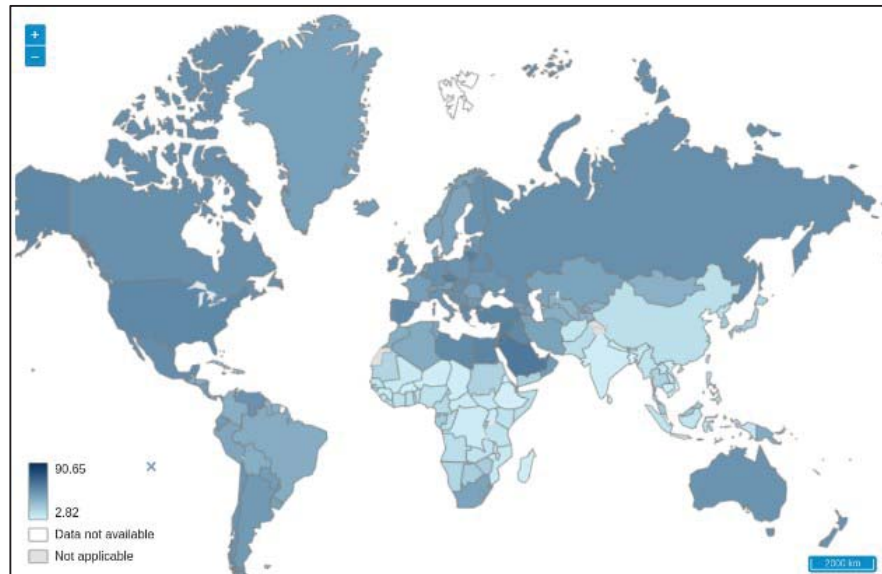
El incremento de la prevalencia del sobrepeso y la obesidad es un problema de salud pública que cobra cada vez más relevancia a nivel mundial. La simple definición de obesidad como una enfermedad caracterizada por un exceso de grasa corporal no se ajusta adecuadamente a los daños inducidos en la salud de los individuos ni refleja los grandes costos financieros que ésta impone a las sociedades (Buse et al., 2024; Conway and Rene, 2004; Ferreira et al., 2024). Aun así, tanto para la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD, por sus siglas en inglés International Classification of Diseases) como el World Obesity Atlas del 2022, publicado por la World Obesity Federation (“World Obesity Atlas 2022,” 2022), anuncian que la obesidad es una enfermedad crónica compleja definida por una adiposidad excesiva que puede perjudicar la salud. Además, en la actualización de marzo del 2024, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define al sobrepeso como una afección que se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa, y a la obesidad como una compleja enfermedad crónica que se define por una acumulación excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (World Health Organization, 2024a). Se entiende a la obesidad como un estadio más grave de sobrepeso. Sin embargo, y como se discutirá en este trabajo, el sobrepeso es un componente de la obesidad, la que es una condición compleja, multifactorial, con consecuencias sobre la salud física y mental, y con impacto sobre las relaciones sociales que terminan afectando la calidad de vida de los individuos.

El método más utilizado para medir e identificar la obesidad es el índice de masa corporal (IMC), calculado como el peso, en kilogramos, dividido por la altura, en metros, al cuadrado. En adultos, un IMC de ≥ 25 kg/m² se define como sobrepeso y de ≥ 30 kg/m² se define como obesidad, y es la medida estándar utilizada por la OMS. En el caso de los niños y adolescentes, se utilizan diferentes puntos de corte en función de la edad y el sexo, para ajustar los cambios fisiológicos del IMC que se observan durante el desarrollo normal (World Health Organization, 2024a). A nivel individual, el IMC es una importante herramienta de cribado, rápida y fácil de medir en muchos entornos diferentes. También es una medida importante para el seguimiento de la prevalencia de la obesidad a nivel de población y para su uso en estudios epidemiológicos. Sin embargo, la complejidad de la obesidad no puede captarse o definirse simplemente mediante el IMC, y existen otras medidas que permiten una evaluación más amplia del grado de compromiso de la salud

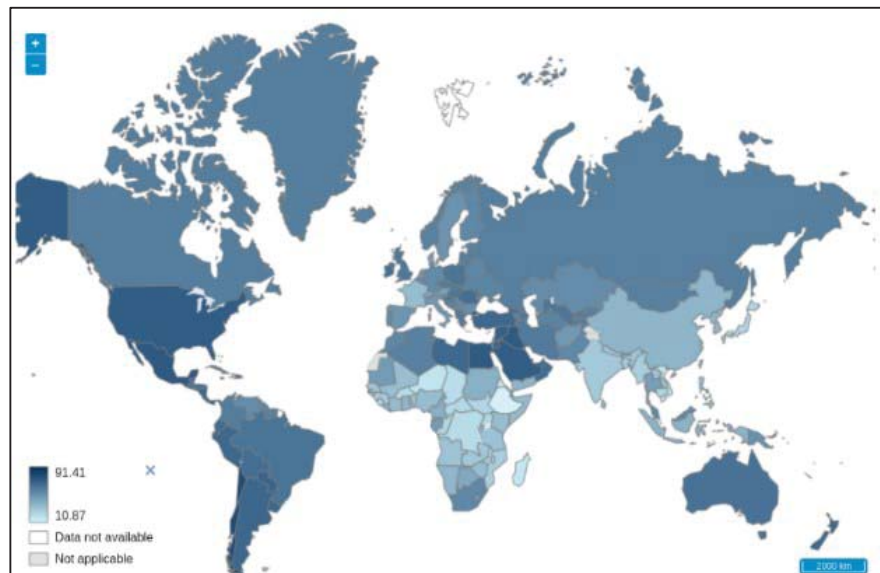
debido a un mayor porcentaje de grasa corporal. Dichas evaluaciones no son fáciles de utilizar o implantar en muchos sistemas sanitarios actuales. Esto significa que, desde una perspectiva epidemiológica, el IMC sigue siendo el mejor marcador a nivel poblacional (“World Obesity Atlas 2022,” 2022).

En 2022, 2500 millones de adultos de 18 años o más, que representaba un 43% de la población mundial, tenían sobrepeso. Esto significa un aumento con respecto a 1990, cuando el porcentaje de adultos de 18 años o más con sobrepeso era del 25% (**Esquema 1**). Además, en 2022 más de 890 millones, que representaba un 16% de los adultos, eran obesos, aumentándose la prevalencia de la obesidad en todo el mundo en más del 100% entre 1990 y 2022 (**Esquema 2**). En particular, en Argentina la prevalencia de adultos con sobrepeso era de 43,4% en 1990 y de 68,4% en 2022, mientras que la prevalencia de adultos con obesidad era de 12,7% en 1990 y de 35,4% en 2022 (Ministerio de Salud, 2024; World Health Organization, 2024b).

A-



B-

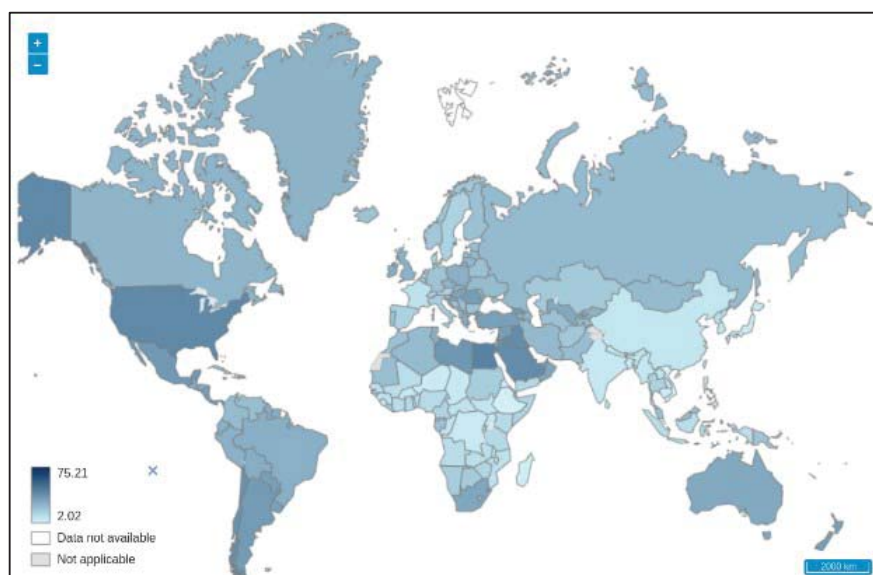


Esquema 1: Prevalencia de adultos con sobrepeso a nivel mundial, índice de masa corporal ≥ 25 (%) en A) 1990 y B) 2022 (Organización Mundial de la Salud).

A-



B-



Esquema 2: Prevalencia de adultos con obesidad a nivel mundial, índice de masa corporal ≥ 25 (%) en A) 1990 y B) 2022 (Organización Mundial de la Salud).

Por otro lado, es aún más preocupante la tasa de sobrepeso y obesidad infantil del mundo actual. Se estima que, en 2022, 37 millones de niños menores de 5 años tenían sobrepeso, y más de 390 millones de niños y adolescentes de 5 a 19 años tenían sobrepeso. La prevalencia del sobrepeso (lo que incluye la obesidad) entre los niños y adolescentes de 5 a 19 años ha aumentado drásticamente, pasando del 8% en 1990 al 20% en 2022. Este aumento ha afectado de la misma manera a niños y niñas: en 2022, el 19% de las

niñas y el 21% de los niños tenían sobrepeso (World Health Organization, 2024a). Cada aspecto adverso del entorno en que los niños se conciben, nacen y crecen puede agravar sus riesgos de padecer sobrepeso u obesidad y complicaciones asociadas. Los niños obesos o con sobrepeso tienden a seguir siendo obesos en la edad adulta y tienen más probabilidades de padecer enfermedades no transmisibles como la diabetes y las enfermedades cardiovasculares a edades tempranas (Fernandez-Twinn et al., 2019; Scheidl et al., 2023a).

No sólo es alarmante el incremento en la prevalencia, sino también su impacto sobre la calidad de vida de las personas que lo padecen. El sobrepeso y la obesidad son de las enfermedades metabólicas más prevalentes en el mundo desarrollado y constituyen una de las causas fundamentales del incremento de la morbilidad. Un IMC elevado constituye un factor de riesgo de múltiples enfermedades crónicas no transmisibles como la diabetes, la hipertensión vascular, la enfermedad cerebrovascular, los trastornos del aparato locomotor (principalmente la osteoartritis) y algunos cánceres (endometrio, mama, ovarios, próstata, hígado, vesícula biliar, riñones y colon) (Bray, 2004; Friedman, 2004). Además, tienen importantes repercusiones psicológicas, sociales y económicas en las personas que las padecen.

El sobrepeso y la obesidad tienen una amplia gama de factores impulsores y determinantes. La genética, la biología, el acceso a la atención sanitaria, la salud mental, los factores socioculturales, la equidad, los alimentos ultraprocesados, la economía y los contaminantes medioambientales son todos ellos raíces de la obesidad. Estas raíces interactúan y se combinan entre sí, dando lugar a las tendencias que vemos hoy en día (Blüher, 2019; Ferreira et al., 2024; “World Obesity Atlas 2022,” 2022). Pero además está muy claro que hay una transmisión vertical no genética de la susceptibilidad al desarrollo de patologías metabólicas como el exceso de peso, diabetes y patologías relacionadas. Durante la vida intrauterina y el periodo postnatal temprano, los individuos están expuestos al entorno materno. Esta exposición desempeña un papel crucial en la determinación de su metabolismo futuro, programando alteraciones metabólicas en la descendencia y generándoles una mayor susceptibilidad a desarrollar diversas patologías en su vida adulta (Fernandez-Twinn et al., 2019; Hufnagel et al., 2022).

Obesidad y metabolismo

La obesidad, un fenómeno de etiología multifactorial, resulta de la compleja interacción entre diversos factores, incluyendo la dieta, el estadio de desarrollo, la edad, el ambiente, la actividad física y la predisposición genética (Blüher, 2019; Ferreira et al., 2024).

Esta condición está estrechamente vinculada a la regulación de las reservas de energía, donde se produce una interacción compleja entre el sistema nervioso central (SNC), particularmente en el hipotálamo, y la movilización de las reservas de grasas corporales (Harrold et al., 2012). En el hipotálamo, una variedad de neuropéptidos, neurotransmisores, insulina y leptina trabajan en conjunto para regular la ingesta, el almacenamiento y el gasto energético, coordinando así respuestas conductuales, fisiológicas y metabólicas (Harrold et al., 2012; Heindel et al., 2017).

Un factor importante para el metabolismo es la regulación de la homeostasis de la glucosa. La insulina, hormona proteica sintetizada en el páncreas, desempeña un papel crucial en el metabolismo de la glucosa. En condiciones fisiológicas de sensibilidad a la insulina, esta hormona reduce las concentraciones circulantes de glucosa al estimular su utilización en el músculo y el tejido adiposo, mientras suprime la producción de glucosa en el hígado (Rui, 2014; Heindel et al., 2017). Cuando esta regulación falla, y el metabolismo no equilibra las concentraciones de la glucosa correctamente, se pueden desarrollar patologías relacionadas a la obesidad como la intolerancia a la glucosa o la diabetes.

En individuos con obesidad, se observa una expansión del tejido adiposo por hiperplasia (proliferación) e hipertrofia (aumento de tamaño por acumulación excesiva de lípidos) del adipocito, lo que conduce a cambios en la secreción de adipoquinas. Los adipocitos maduros sintetizan una serie de moléculas peptídicas conocidas como adipoquinas, que incluyen la leptina, adiponectina, resistina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleuquina 6 (IL-6), entre otras (Heindel et al., 2017). Estas adipoquinas desempeñan roles clave en la regulación de la ingesta, la homeostasis energética, el metabolismo y participan en respuestas inmunes e inflamatorias (Hotamisligil, 2017). Esta expansión del tejido adiposo genera hipoxia y provoca la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que genera la liberación de más citoquinas

proinflamatorias. Estos cambios alteran la sensibilidad periférica a la insulina, provocando inflamación crónica sistémica y aumentando el riesgo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular (Trayhurn, 2013; Heindel et al., 2017). La resistencia a la insulina resultante de esta condición lleva a una incapacidad de la hormona para activar correctamente la síntesis de glucógeno en el hígado y para inhibir la gluconeogénesis, lo que resulta en niveles elevados de glucosa en la sangre. En este estado, la glucosa no es captada de manera eficiente por células musculares debido a la disfunción del transportador de glucosa 4 (GLUT4), lo que provoca hiperglucemia crónica. A largo plazo, esta situación puede afectar al páncreas, disminuyendo su capacidad de secretar insulina, y acelerando el desarrollo de la diabetes tipo 2. Además, factores genéticos, dietéticos y ambientales exacerban este deterioro metabólico, contribuyendo a la aparición de complicaciones hepáticas y metabólicas a nivel sistémico (Rui, 2014; Heindel et al., 2017).

Obesidad e inflamación

La obesidad, acompañada de un incremento progresivo del número y tamaño de los adipocitos, genera hipoxia en el tejido adiposo debido a la limitada vascularización. Esto provoca la activación de células inmunes residentes, especialmente macrófagos, que secretan citoquinas proinflamatorias, tal como IL-1 β , TNF- α e IL-6, promoviendo un ambiente proinflamatorio tanto local como sistémico (Virtue and Vidal-Puig, 2010; Odegaard and Chawla, 2011; Kalupahana et al., 2012; Hotamisligil, 2017). Este ambiente se amplifica a través de la liberación de ROS, lo que genera daño oxidativo en proteínas, lípidos y carbohidratos (Pararasa et al., 2015). Este proceso de inflamación crónica puede resultar en enfermedades metabólicas como la resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, hígado graso, entre otras.

En contextos de inflamación, el óxido nítrico (ON) desempeña un papel central. Bajo condiciones fisiológicas, el ON producido por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) actúa como un regulador homeostático, favoreciendo la vasodilatación y mejorando la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, en estados de obesidad e inflamación crónica, se reduce la actividad de eNOS y aumenta la de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que genera grandes cantidades de ON en respuesta a estímulos

proinflamatorios. Este exceso promueve la formación de especies reactivas de nitrógeno (RNS), como el peroxinitrito, que incrementan el daño oxidativo. Entre los mecanismos de daño más relevantes se encuentra la lipoperoxidación, un proceso mediante el cual los radicales libres oxidan ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, generando productos tóxicos como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE), los cuales alteran la integridad de las membranas y contribuyen a la disfunción endotelial y al deterioro progresivo del entorno metabólico (Hotamisligil, 2017).

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) es otro componente clave en la respuesta inflamatoria que actúa como un sensor del estado redox celular. Activado por las citoquinas y ROS, NF- κ B regula la expresión de genes relacionados con la inflamación, incluyendo iNOS, perpetuando así un ciclo de inflamación crónica y estrés oxidativo en el tejido adiposo (Marseglia et al., 2014). Esta situación empeora la resistencia a la insulina, ya que las ROS y RNS resultantes de la disfunción mitocondrial inhiben la señalización normal de la insulina en los tejidos periféricos (Marseglia et al., 2014; Pararasa et al., 2015; Pérez et al., 2016).

Este estado proinflamatorio y prooxidante se caracteriza por un aumento en los lípidos depositados y circulantes, así como por un incremento en la concentración de citoquinas proinflamatorias y ROS, que a su vez inducen la oxidación de lípidos, proteínas y carbohidratos, y la peroxidación lipídica. Esta última implica la participación de diversas ROS y sus subproductos, que sirven como marcadores de daño por estrés oxidativo (Bondia-Pons et al., 2012; Marseglia et al., 2014).

A medida que los adipocitos alcanzan su capacidad máxima de almacenamiento, los lípidos se acumulan de forma ectópica en la periferia de tejidos no adiposos como el hígado, el corazón, el músculo y de manera perivascular, lo que promueve la resistencia a la insulina y el estrés oxidativo en estos órganos (Guo, 2014). En resumen, la inflamación y el estrés oxidativo perpetuados por la activación de NF- κ B y la sobreproducción de ON contribuyen a la patogénesis de complicaciones metabólicas, como la enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) y la disfunción endotelial (Marseglia et al., 2014).

Obesidad y gestación

El embarazo y la lactancia son estados metabólicamente exigentes, donde la glucosa materna es una fuente crucial de energía para el crecimiento fetal y la producción de leche durante la lactancia. Por consiguiente, se producen adaptaciones significativas en los sistemas que regulan la homeostasis de la glucosa para satisfacer esta mayor demanda. Como parte de estos cambios, los niveles de insulina se encuentran elevados durante el embarazo y disminuidos durante la lactancia (Ladyman and Brooks, 2021).

En particular, durante la primera mitad del embarazo, el aumento de estrógeno y progesterona estimula la proliferación de las células β pancreáticas, lo que resulta en un incremento en la secreción de insulina. Esta respuesta hormonal también promueve la acumulación de lípidos en los tejidos periféricos al inhibir la lipólisis (Chavan-Gautam et al., 2018; Bandres-Meriz et al., 2023). Paralelamente, se observa un aumento en la acumulación de grasa en el cuerpo materno, evidenciado tanto en mujeres como en modelos experimentales. Esta acumulación de reservas grasas es el resultado de la hiperfagia y la mayor síntesis de lípidos por parte del tejido adiposo, debido a una mayor sensibilidad a la insulina (Herrera et al., 2006; Chavan-Gautam et al., 2018).

A medida que avanza la gestación, hacia la segunda mitad del embarazo, se produce un incremento en las hormonas prolactina y cortisol, lo que desencadena una resistencia a la insulina fisiológica. Este cambio endocrino impulsa el catabolismo lipídico, facilitando la liberación de ácidos grasos y cuerpos cetónicos en la circulación, que llegan a la placenta para garantizar la disponibilidad de nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo fetal (Herrera et al., 2006). Se observa una disminución en la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) en el tejido adiposo, lo que reduce la incorporación de triglicéridos desde la circulación. Al mismo tiempo, se incrementa la actividad lipolítica del adipocito, liberando ácidos grasos no esterificados y glicerol en la circulación. Estas moléculas son captadas por el hígado, donde pueden ser re-esterificadas a triglicéridos y liberadas como parte de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Los triglicéridos de las VLDL son hidrolizados en la membrana del trofoblasto, y los ácidos grasos liberados son transportados hacia la placenta (Herrera and Ortega-Senovilla, 2014; Lewis and Desoye, 2017; Duttaroy and Basak, 2022). Una fracción de los ácidos grasos captados por el hígado es oxidada en los hepatocitos para proporcionar energía metabólica y producir cuerpos cetónicos, que son liberados y captados por la

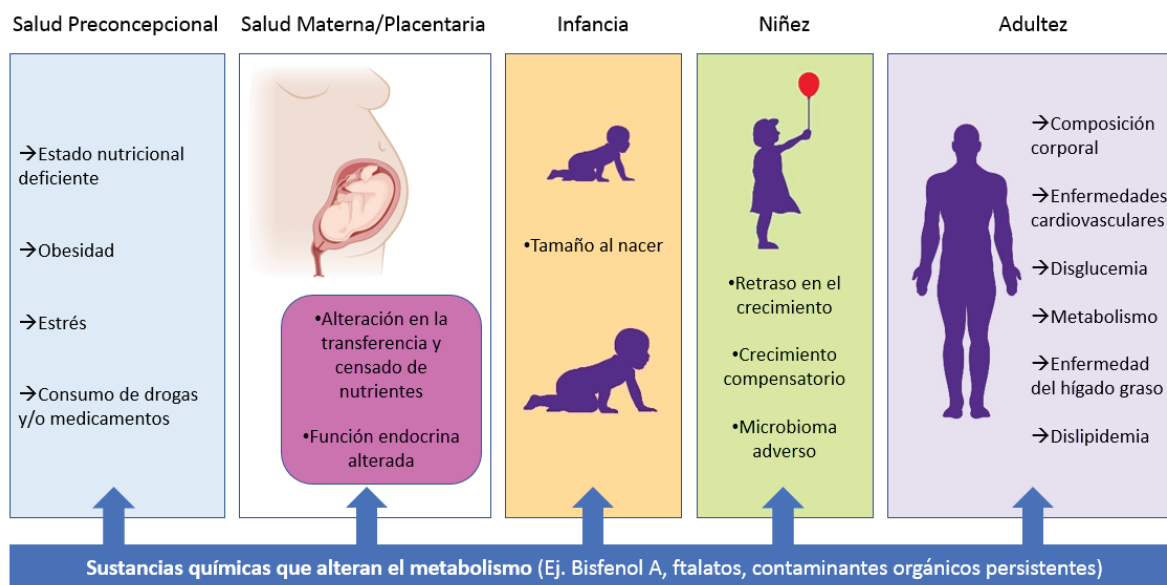
placenta. Estos procesos metabólicos intensificados en la segunda mitad de la gestación, contribuyen a la hiperlipidemia materna y facilitan la nutrición fetal, así como el rápido crecimiento y acumulación lipídica necesarios para el desarrollo fetal (Herrera et al., 2006; Chavan-Gautam et al., 2018).

En un entorno obesogénico, caracterizado por la inflamación crónica, la resistencia a la insulina fisiológica del final de la gestación se agrava, presentando a término altas concentraciones de insulina, leptina y lípidos circulantes. La insulina, al igual que la leptina, incrementan la expresión de los transportadores de lípidos resultando en un incremento en la afluencia de lípidos y nutrientes hacia el feto (Mazzucco et al., 2013a; Pérez-Pérez et al., 2020; Kelly et al., 2020; Hufnagel et al., 2022; Guadix et al., 2023). En modelos animales y en gestantes con obesidad, la descendencia puede presentar variabilidad en cuanto al peso, lo que parece depender de la capacidad placentaria para contrarrestar el estado prooxidante y proinflamatorio, asegurando así el flujo sanguíneo y el transporte adecuado de oxígeno y nutrientes necesarios para el crecimiento fetal (Jawerbaum and White, 2017).

PROGRAMACIÓN METABÓLICA

La hipótesis de la programación metabólica en el desarrollo fetal postula que el entorno durante las primeras etapas de la vida (desde la concepción hasta la primera infancia) influye en las características de los descendientes en etapas posteriores, incluida su susceptibilidad al desarrollo de la obesidad y distintos trastornos metabólicos. Esta teoría, inicialmente propuesta por C. Nicholas Hales y David Barker y reformulada como la hipótesis de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (DOHaD por sus siglas en inglés Developmental Origins of Health and Disease), sugiere que eventos ambientales adversos durante etapas críticas del desarrollo pueden llevar a cambios duraderos en la biología que predisponen a enfermedades en la edad adulta (Barker, 1986; Fitzgerald et al., 2020; Hoffman et al., 2021). Barker y otros demostraron que los bebés con bajo peso al nacer como consecuencia de la malnutrición materna en la posguerra desarrollaron mayor susceptibilidad a las enfermedades en la vida adulta, incluyendo enfermedad coronaria, obesidad, apoplejía, diabetes tipo 2, osteoporosis, aumento de la presión arterial, dislipidemia, metabolismo alterado de la glucosa y disfunción metabólica (Barker et al., 1993, 1989; Barker, 2007). El concepto de orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad postula que las raíces de la obesidad, o la predisposición a la obesidad, se establecen en el útero, en un proceso que continúa durante la lactancia y la niñez temprana (Fitzgerald et al., 2020; Hoffman et al., 2021).

Cuando existe una perturbación a la que la madre está expuesta (F0, por ejemplo, dieta materna alterada), ésta afecta directamente al feto en desarrollo en el útero (F1) y también a las células germinales que formarán la generación F2 (**Esquema 3**). Datos muy limitados están disponibles en la generación F3 y más allá. Sin embargo, trabajos realizados en modelos experimentales de obesidad muestran el peligro de la programación transgeneracional y sus efectos nocivos en la cuarta descendencia (Rhind et al., 2001; Drake and Reynolds, 2010; Drake and Seckl, 2011; Dupont et al., 2012; Galarza et al., 2017; Hilal et al., 2020; Meneghini et al., 2024).



Esquema 3: Impacto de los factores estresantes perinatales en la programación metabólica en la descendencia.

La hipótesis de la programación metabólica en el desarrollo ha abierto un nuevo paradigma de investigación para comprender el riesgo de enfermedad crónica, que va más allá de las explicaciones basadas en influencias genéticas y de estilo de vida (Jawerbaum and White, 2017; Fernandez-Twinn et al., 2019). En vista de la creciente prevalencia de la obesidad en el embarazo y su asociación con diabetes gestacional, ahora también existe un interés en la influencia perjudicial de la obesidad materna sobre el riesgo de enfermedad en la generación F1 y las siguientes generaciones (Rhind et al., 2001; Drake and Reynolds, 2010; Drake and Seckl, 2011; Dupont et al., 2012; Hilal et al., 2020). Investigaciones han demostrado que la desnutrición o la obesidad materna durante el embarazo y la lactancia pueden influir en la salud de la descendencia, aumentando la susceptibilidad a enfermedades como enfermedad cardiovascular, diabetes tipo 2 y obesidad en la vida adulta (Fitzgerald et al., 2020). El estado metabólico materno, la nutrición y factores estresantes modifican el programa metabólico que seguirá el organismo a partir de ese momento (Catalano and Shankar, 2017; Thompson, 2020). Entonces, el sobrepeso y la obesidad parental predisponen a la descendencia a varios cambios que afectan su metabolismo a lo largo de la vida. En particular se han identificado alteraciones hepáticas e intestinales que componen la EHGNA y que inducen a su vez el desarrollo de la obesidad (Lecoutre et al., 2021; Kobayashi et al., 2022). La epigenética, especialmente la metilación del ADN y las modificaciones post

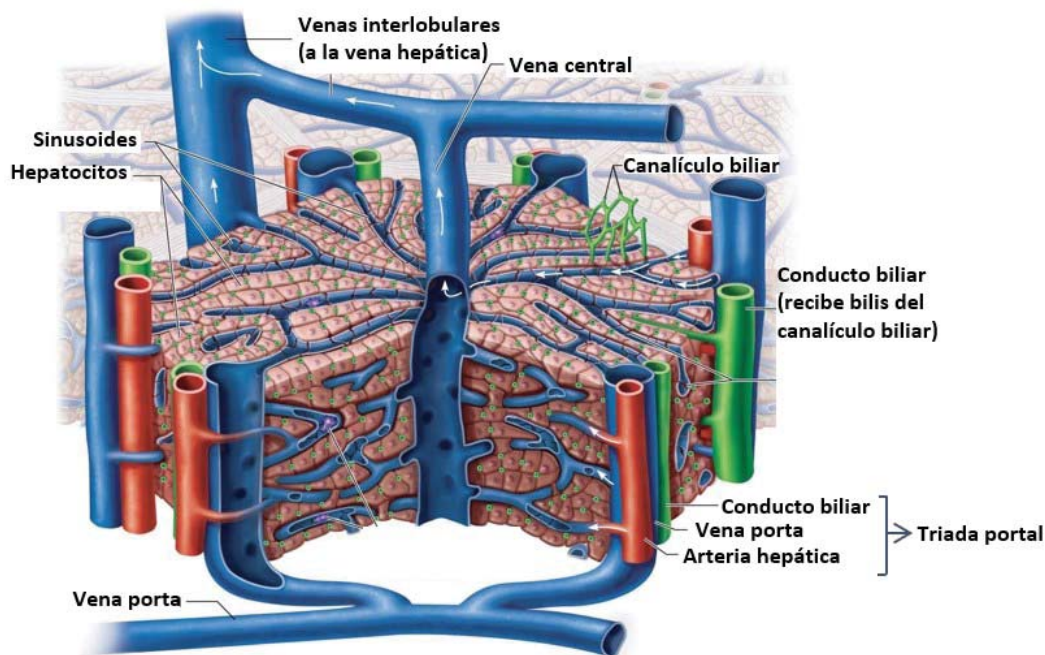
traduccionales de histonas, y se ha destacado como un mecanismo clave detrás de estos efectos transgeneracionales (Goyal et al., 2019).

La programación metabólica en el desarrollo fetal puede afectar a múltiples órganos, incluidas las gónadas, y estos efectos pueden ser persistentes a través de varias generaciones (Hilal et al., 2020). La nutrición materna adecuada es crucial para el desarrollo óptimo de la descendencia, influyendo en aspectos como el crecimiento placentario, el transporte de nutrientes y el desarrollo fetal. *Es esencial entender los efectos de la nutrición materna en diferentes etapas del desarrollo para comprender la susceptibilidad a enfermedades en la edad adulta. Este conocimiento puede colaborar en el planeamiento de estrategias para mejorar la salud materna y fetal, reduciendo así el riesgo de enfermedades crónicas en la descendencia.*

EL HÍGADO

El hígado es un órgano clave para la homeostasis metabólica del organismo. Actúa como un centro metabólico que comunica a varios tejidos y órganos, incluidos el músculo esquelético y el tejido adiposo. Los alimentos ingeridos son convertidos a moléculas sencillas que son absorbidas en el intestino, pasan al torrente sanguíneo y se transportan al hígado a través del sistema de circulación de la vena porta. La vena porta, procedente del tubo digestivo y la arteria hepática, rama de la arteria aorta, son los dos principales sistemas vasculares que suministran sangre al hígado (Abdel-Misih and Bloomston, 2010; Trefts et al., 2017).

La unidad funcional del hígado es el lobulillo hepático, en donde se pueden observar los hepatocitos, las principales células del tejido hepático. Entre las células, se encuentran el canaliculo biliar y las sinusoides (capilares hepáticos formados por ramas finas provenientes de la vena porta y la arteria hepática). En los ángulos de los lobulillos hepáticos se sitúan las triadas portal, constituida por una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta y un conducto biliar (**Esquema 4**). La sangre proveniente tanto de la vena porta como de la arteria hepática se mezcla en las sinusoides hepáticas y abandona el órgano a través de las venas hepáticas, también llamadas suprahepáticas, que finalmente drenan en la vena cava inferior. La bilis, involucrada en la digestión de las grasas, se fabrica en el hígado, se almacena en la vesícula biliar y se libera en el intestino cuando se ingieren alimentos, en donde gran parte se reabsorbe (Malarkey et al., 2005; Abdel-Misih and Bloomston, 2010; Trefts et al., 2017). En las ratas, por la ausencia de vesícula, la bilis es producida continuamente por el hígado y se libera de forma más constante al intestino delgado (especialmente al duodeno), sin pasar por un almacenamiento previo como en los humanos.

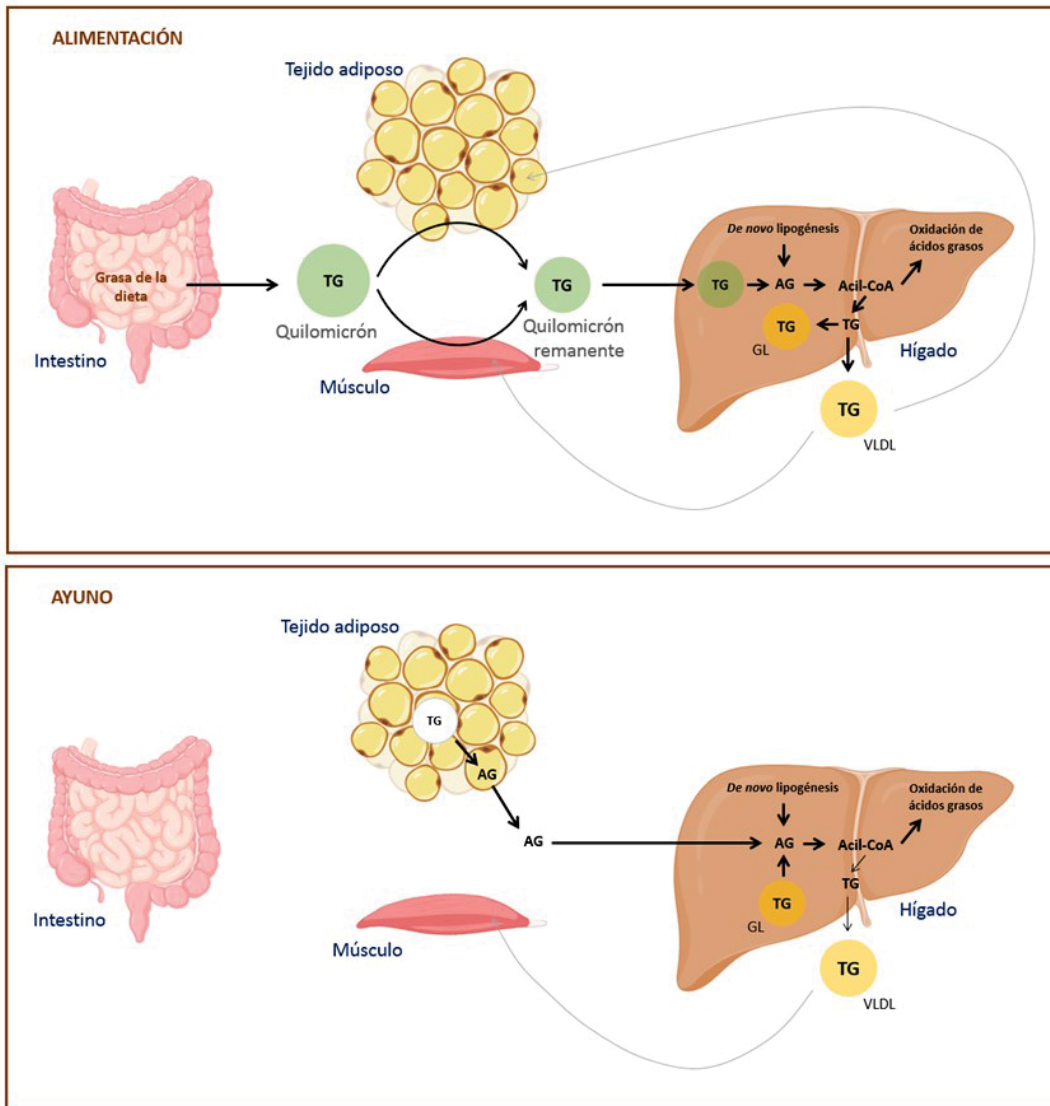


Esquema 4: Representación gráfica del lobulillo hepático.

El hígado se encarga de múltiples funciones, entre las que se incluyen: producción de la bilis necesaria para la digestión y absorción de nutrientes, metabolismo de carbohidratos (entre los que se destaca la síntesis de glucógeno a partir de glucosa, almacenamiento y degradación de glucógeno), metabolismo de lípidos (síntesis de ácidos grasos, colesterol y esterificación en ésteres de colesterol y triglicéridos, conversión de glúcidos y proteínas en ácidos grasos), metabolismo de proteínas (síntesis de albúmina, de factores de coagulación y de lipoproteínas para transportar ácidos grasos a través de la sangre, como VLDL, HDL y LDL), funciones inmunológicas, biotransformación de sustancias nocivas endógenas y exógenas (Malarkey et al., 2005; Trefts et al., 2017). El metabolismo energético del hígado está estrechamente controlado. Se han identificado múltiples señales nutritivas, hormonales y neuronales que regulan el metabolismo de la glucosa, los lípidos y los aminoácidos en el hígado (Nguyen et al., 2008; Rui, 2014; Trefts et al., 2017). La disfunción de vías de señalización y del metabolismo hepático causa o predispone a la EHGNA y promueve el desarrollo de diabetes tipo 2 (Rui, 2014; Habibullah et al., 2024).

Metabolismo hepático de ácidos grasos

Los hepatocitos reciben los ácidos grasos del torrente sanguíneo, en el cual están presentes los ácidos grasos que se liberan del tejido adiposo o se absorben de la digestión de alimentos en el tracto gastro intestinal. En el intestino pueden empaquetarse en lipoproteínas grandes y esféricas llamadas quilomicrones, y ser transportados en circulación. En el hepatocito, los ácidos grasos se incorporan mediante la lipoproteína lipasa (LPL) y la lipasa hepática (LH) principalmente. Una vez dentro del hepatocito se esterifican y van a formar parte de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para ser secretadas a la circulación o se reservan en gotas lipídicas (**Esquema 5**) (Alves-Bezerra and Cohen, 2017). Los ácidos grasos también se incorporan en los fosfolípidos, que son un componente esencial de las membranas celulares, y en la capa superficial de las gotas de lípidos, las VLDL y las partículas biliares. En estado de ayuno, los ácidos grasos se oxidan principalmente en las mitocondrias para generar energía y cuerpos cetónicos (Nguyen et al., 2008; Rui, 2014; Heindel et al., 2017; Alves-Bezerra and Cohen, 2017).



Esquema 5: Metabolismo de ácidos grasos durante la alimentación y el ayuno. TG: triglicéridos, AG: ácido graso, GL: gota lipídica, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

Cuando los carbohidratos son abundantes, el hígado no sólo utiliza la glucosa como principal combustible metabólico, sino que también convierte la glucosa en ácidos grasos. En estados de sobrealimentación, el incremento de glucosa circulante provoca un incremento en la insulina que favorece la síntesis hepática de ácidos grasos. La glucólisis genera piruvato, que puede ser transformado en la mitocondria primero en acetil-CoA y posteriormente en citrato. Éste sale al citosol, regenerándose en acetil-CoA, y es usado para sintetizar malonil-CoA que es sustrato de la sintasa de ácidos grasos (FAS) para sintetizar palmitato. La acumulación de malonil-CoA inhibe a la enzima palmitoil-

carnitina transferasa 1 (CPT-1), inhibiendo la β -oxidación de ácidos grasos. Los ácidos grasos no degradados son transformados en triglicéridos y posteriormente secretados en forma de VLDL (Nguyen et al., 2008; Rui, 2014).

Por el contrario, durante el ayuno los niveles de insulina descienden, favoreciendo la hidrólisis de los triglicéridos en el tejido adiposo a través de la β -oxidación de los ácidos grasos, formando cuerpos cetónicos (principalmente acetoacetato y β -hidroxibutirato), los cuales son exportados mediante la circulación a los tejidos y consumidos cuando escasea la glucosa (principalmente en el cerebro). Además, en el hígado la ausencia de insulina provoca una disminución de la síntesis de ácidos grasos y de malonil-CoA, lo que desinhibe la β -oxidación. Por su parte, la glucogenogénesis se inhibe y la gluconeogénesis se desinhibe favoreciendo la liberación de glucosa a circulación (Canbay et al., 2007; Nguyen et al., 2008).

Incorporación de ácidos grasos en el hígado

Los ácidos grasos, provenientes tanto de la dieta como de la lipólisis del tejido adiposo, son transportados hacia el hígado en la circulación unidos a albúmina (en el caso de ácidos grasos libres) o incorporados en lipoproteínas, junto con triglicéridos, fosfolípidos y colesterol. En el hígado, la LPL y la LH, una enzima clave en la incorporación de lípidos, hidrolizan los triglicéridos presentes en las lipoproteínas ricas en triacilglicéridos, como los quilomicrones y las VLDL, liberando ácidos grasos que pueden ser captados por el hígado (Canbay et al., 2007; Trefts et al., 2017; Alves-Bezerra and Cohen, 2017).

La incorporación de ácidos grasos dentro de los hepatocitos está mediada principalmente por proteínas transportadoras como la traslocasa de ácidos grasos (FAT/CD36) y las proteínas transportadoras de ácidos grasos 2 y 4 (FATP2 y FATP4), que facilitan la entrada de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) tanto al citoplasma como a los peroxisomas (Canbay et al., 2007; Kazantzis and Stahl, 2012; Mashek, 2013). Previamente en nuestro laboratorio vimos que los hígados de los fetos y la descendencia de madre con sobrepeso presentaban niveles incrementados de CD36 (Heinecke et al., 2020).

Dentro de la célula, los LCFA son activados por la acil-CoA sintasa de cadena larga (ACSL), convirtiéndose en LCFA-CoA, una forma que les permite participar en diferentes rutas metabólicas. Estos pueden ser transportados hacia distintos compartimentos celulares por proteínas de unión a ácidos grasos (FABP), como FABP4, que facilita su absorción, tráfico intracelular y metabolismo (Mashek, 2013; Storch and Corsico, 2008; Canbay et al., 2007). El destino metabólico de los LCFA-CoA en el hepatocito depende de las necesidades energéticas y del estado metabólico del organismo. Pueden ser utilizados para la síntesis de triglicéridos y su almacenamiento en gotas lipídicas, incorporados en lipoproteínas para su exportación o dirigidos hacia la β -oxidación (Nguyen et al., 2008; Alves-Bezerra and Cohen, 2017).

Alteraciones en el tráfico y metabolismo de los ácidos grasos en el hígado están involucradas en diversas patologías, como la EHGNA, la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico. El equilibrio entre captación, almacenamiento y oxidación de ácidos grasos es fundamental para evitar la acumulación lipídica excesiva y el desarrollo de disfunción hepática.

Lipogénesis y su regulación

La lipogénesis es el proceso de síntesis de ácidos grasos y triglicéridos que ocurre principalmente en el hígado y el tejido adiposo. Se inicia con la conversión de acetil-CoA en malonil-CoA, catalizada por la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC). Luego, el malonil-CoA, junto con el NADPH generado en la vía de las pentosas fosfato, es utilizado por la sintasa de ácidos grasos (FAS) para la producción de ácido palmítico, un ácido graso de 16 carbonos. Este puede ser posteriormente alargado y desaturado en el retículo endoplasmático para generar ácidos grasos de cadena larga (LCFA) con diferentes grados de insaturaciones, esenciales para diversas funciones celulares (Canbay et al., 2007; Rui, 2014).

En el hígado, los ácidos grasos sintetizados de novo o provenientes de la dieta se incorporan en triglicéridos, que se empaquetan en VLDL para ser transportados hacia tejidos extrahepáticos, como el tejido adiposo, donde pueden almacenarse como reserva energética. La regulación de la lipogénesis está fuertemente influenciada por el estado nutricional. Durante el ayuno, los ácidos grasos son preferentemente oxidados en las

mitocondrias para la generación de energía y cuerpos cetónicos. En contraste, en condiciones de abundancia de carbohidratos, el hígado no solo utiliza la glucosa como fuente primaria de energía, sino que también la convierte en ácidos grasos para su almacenamiento (Nguyen et al., 2008).

Uno de los principales reguladores de la lipogénesis es la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP-1c), un factor de transcripción activado por la insulina. El factor de transcripción SREBP-1c induce la expresión de genes clave involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos, incluyendo ACC y FAS, promoviendo la síntesis y acumulación de lípidos en respuesta a la ingesta calórica. Además, la actividad de SREBP-1c es modulada por los niveles de colesterol intracelular y la disponibilidad de nutrientes a través de mTOR, lo que lo convierte en un mediador esencial en la homeostasis lipídica hepática (Soyal et al., 2015; Chandrasekaran and Weiskirchen, 2024).

Además, la lipogénesis es un proceso regulado por la insulina y otros factores transcripcionales como el receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR- γ). Este receptor nuclear es clave en la diferenciación de adipocitos y en la captación y almacenamiento de ácidos grasos. Se considera un regulador metabólico crucial del metabolismo lipídico hepático y la inflamación. Su activación mejora la sensibilidad a la insulina y redistribuye los lípidos hacia el tejido adiposo, reduciendo la lipotoxicidad. Sin embargo, en el hígado su sobreexpresión puede contribuir a la acumulación de lípidos, como ocurre en la EHGNA (Chen et al., 2023).

El receptor hepático X alfa (LXR- α) es otro regulador esencial de la lipogénesis hepática, ya que activa la expresión de SREBP-1c y FAS, favoreciendo la síntesis de ácidos grasos en respuesta a niveles elevados de colesterol intracelular. Su activación puede contribuir a la acumulación de lípidos hepáticos, promueve la expresión de genes implicados en la efluencia de colesterol e inhibe la expresión de genes proinflamatorios regulados por NF- κ B, lo que lo vincula con la fisiopatología de la EHGNA (Chandrasekaran and Weiskirchen, 2024). LXR- α se activa principalmente por oxisteroides, que son derivados oxidados del colesterol. Su activación busca mantener la homeostasis lipídica y prevenir el exceso de colesterol intracelular (Bovenga et al., 2015).

β -Oxidación de Ácidos Grasos

La β -oxidación es el proceso mediante el cual los ácidos grasos se degradan para generar energía. Tiene lugar principalmente en la mitocondria, pero los peroxisomas también desempeñan un papel clave en la oxidación de ácidos grasos muy largos. Este proceso es fundamental para mantener el equilibrio energético, especialmente en estados de ayuno, cuando la β -oxidación hepática se intensifica para suministrar energía y producir cuerpos cetónicos (Canbay et al., 2007; Nakamura et al., 2014; Rui, 2014).

→ Oxidación Mitocondrial de Ácidos Grasos

La β -oxidación mitocondrial es la principal vía de oxidación de ácidos grasos y ocurre mayoritariamente en el hígado y el músculo. En el hígado, proporciona energía para la gluconeogénesis y la síntesis de cuerpos cetónicos, siendo regulada por el estado nutricional. En ayuno, la β -oxidación se incrementa, mientras que en estado alimentado se inhibe debido al aumento de malonil-CoA, que bloquea la actividad de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT-1), impidiendo la entrada de ácidos grasos a la mitocondria (McGarry et al., 1977; Stefanovic-Racic et al., 2008; Rui, 2014).

Los LCFA son activados por la acil-CoA sintetasa y posteriormente transportados al interior mitocondrial a través del sistema de la carnitina, en el que intervienen CPT-1, la translocasa de carnitina y CPT-2. Los ácidos grasos de cadena corta pueden atravesar la membrana directamente hacia la matriz mitocondrial (Nguyen et al., 2008). Una vez en la matriz mitocondrial, los ácidos grasos sufren un proceso cíclico de deshidrogenación, hidratación, oxidación y tiólisis, catalizado por enzimas como la acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCAD), Enoyl-CoA hidratasa, acetil-CoA aciltransferasa 2 (ACAA2), la enzima hidroxiacil-CoA deshidrogenasa trifuncional α (HADHA), entre otras. La actividad de estas enzimas es crucial para evitar la acumulación de lípidos en el hígado (Rui, 2014). La ACAA2 es una enzima tiolítica clave en la vía de oxidación de ácidos grasos que cataliza el paso final de la β -oxidación mitocondrial (Huang et al., 2023). La sobreexpresión de ACAA2 promueve la oxidación de ácidos grasos e inhibe la acumulación de lípidos (Lei et al., 2022). Además, la enzima HADHA desempeña un papel esencial en la degradación de los intermediarios de la β -oxidación, asegurando la producción eficiente de acetil-CoA para su posterior uso en el ciclo de Krebs (Nakamura et al., 2014).

➔ Oxidación Peroxisomal de Ácidos Grasos

Los peroxisomas son orgánulos clave en la oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga (>22 carbonos) y algunos ácidos grasos ramificados, que no pueden ser oxidados directamente en la mitocondria. La oxidación peroxisomal es también una β -oxidación, pero existen notables diferencias (Mannaerts et al., 2000). En este proceso, no es necesaria la carnitina para la entrada de los ácidos grasos. Los ácidos grasos ingresan al peroxisoma mediante proteínas transportadoras de la familia denominada ABC (ATP binding cassette). Se requieren enzimas específicas como la acil-CoA oxidasa (ACO) en la segunda etapa de la oxidación en lugar de la deshidrogenasa, entre otras (Lodhi and Semenkovich, 2014; Rui, 2014). En los peroxisomas los ácidos grasos de cadena muy larga experimentan una oxidación inicial antes de su procesamiento mitocondrial final, indicando una conexión entre ambas organelas, siendo que ambas oxidaciones generan energía en forma de ATP y poder reductor (Demarquoy, 2015).

- ➔ El citocromo P450 4A subfamilia isoforma 1 (CYP4A1) enzima que cataliza la ω -hidroxilación de muchos ácidos grasos. Desempeña un papel importante en el metabolismo de los ácidos grasos e interviene en la producción de mediadores proinflamatorios y especies reactivas del oxígeno, contribuyendo al desarrollo de EHGNA (Zhang et al., 2017).

De manera previa, encontramos alteraciones en la expresión de *Aco*, *Cpt-1*, *Cyp4a1*, *Acaa2* y *Hadha* en los hígados de feto y descendencia de ratas con sobrepeso (Heinecke et al., 2020).

Almacenamiento de lípidos

El almacenamiento intracelular de lípidos proporciona protección contra los efectos tóxicos de las concentraciones excesivas de lípidos, una fuente de energía para el crecimiento celular y los procesos metabólicos, un reservorio de mediadores de la transcripción, y una ventaja de supervivencia durante la inanición. La acumulación anormal de grasa intrahepática en forma de gotas lipídicas citoplásmicas es una característica fisiopatológica temprana del metabolismo hepático alterado que está relacionado con la resistencia a la insulina y la posible progresión a enfermedad hepática

grave (Onal et al., 2017; Scorletti and Carr, 2022). Las gotas lipídicas son organelas subcelulares que almacenan lípidos. Su estructura se asemeja a la de las lipoproteínas circulantes en los mamíferos, que consiste en una monocapa de fosfolípidos que rodea un núcleo de lípidos neutros como triglicéridos y ésteres de colesterol (Ben M’barek et al., 2017; Olzmann and Carvalho, 2019). Aunque son más prominentes en los adipocitos, las gotas de lípidos están presentes en la mayoría de los tipos de células. Las gotas de lípidos varían mucho en tamaño, que van desde menos de 1 μm a $\sim 100 \mu\text{m}$ de diámetro. Los miembros de la familia de la perilipina (PLIN) se encuentran entre las proteínas asociadas a la gota lipídica más abundantes en las células de los mamíferos y funcionan como reguladores fisiológicamente importantes del metabolismo y el tráfico de lípidos celulares (Sztalryd and Kimmel, 2014). Los estudios de disrupción genética en ratones han documentado que se requiere perilipina-2 (PLIN2, adipophilin, ADRP) para la acumulación de lípidos hepáticos en respuesta a la dieta con alto contenido de grasas (Crunk et al., 2013). La abundancia de PLIN2 es directamente proporcional a los niveles de lípidos intracelulares que se encuentran dentro de las células y aumenta en obesidad y distintas patologías que involucran el hígado graso (Onal et al., 2017; Scorletti and Carr, 2022). Hemos encontrado un incremento en la expresión de PLIN2 en los fetos y la descendencia de madre con sobrepeso (Heinecke et al., 2020).

Las gotas lipídicas interactúan estrechamente con orgánulos clave en el metabolismo de los ácidos grasos, como los peroxisomas y las mitocondrias. Durante estados de ayuno o alta demanda energética, los triglicéridos almacenados en estas estructuras son hidrolizados en ácidos grasos libres, los cuales son transportados a los peroxisomas para su β -oxidación inicial y, posteriormente, a las mitocondrias para su completa degradación y producción de ATP. Esta interacción coordinada, y en la que participa el citoesqueleto, asegura un metabolismo eficiente de los lípidos y evita la acumulación de especies lipotóxicas que podrían comprometer la función celular (Nakamura et al., 2014; Olzmann and Carvalho, 2019).

Enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA).

En condiciones de alteraciones metabólicas, los lípidos pueden acumularse patológicamente en distintos tejidos, entre ellos el hígado (Guo, 2014; Marseglia et al., 2014). La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), caracterizada por una acumulación excesiva de triglicéridos dentro de los hepatocitos, y/o esteatosis, es considerada por algunos como la manifestación hepática de la obesidad y el síndrome metabólico (Cusi, 2012; Mendez-Sanchez et al., 2018; Pafili and Roden, 2021). A nivel hepático esta enfermedad se define por un incremento en la deposición de lípidos, la presencia de grandes gotas lipídicas, fibrosis, infiltración de células inmunes, vacuolización y daño tisular hepático por ROS. A nivel sistémico, se pueden observar elevados niveles de enzimas hepáticas como transaminasas, fosfatasa alcalina y bilirrubina, y ácidos biliares que señalan la disfunción hepática (Pafili and Roden, 2021). Además, el hígado graso no alcohólico se caracteriza por presentar resistencia a la insulina, y debido a ello es que la vía hepática de glucogenogénesis se encuentra inhibida y la de gluconeogénesis desinhibida, provocando una mayor liberación de glucosa en la circulación. Sin embargo, la vía lipogénica hepática no se altera por la resistencia a la insulina, por lo que la síntesis de lípidos es estimulada por la gran disponibilidad de lípidos, y generalmente mediada por el aumento de SRBP1 (Guo, 2014). En situaciones de resistencia a la insulina, la alta disponibilidad de ácidos grasos en circulación y la incrementada lipogénesis *de novo*, aumenta la esterificación de ácidos grasos en triglicéridos y ésteres de colesterol, y su secreción dentro de las VLDL alterando el perfil lipídico de la circulación (Lucero et al., 2015).

La prevalencia de la EHGNA oscila entre el 20-30% en la población general y hasta el 75-100% en individuos obesos. Aunque la mayoría de los pacientes con EHGNA permanecen asintomáticos, el 20% evoluciona hasta desarrollar una inflamación hepática crónica (esteatohepatitis no alcohólica, EHNA), que a su vez puede conducir a cirrosis, hipertensión portal, carcinoma hepatocelular y aumento de la mortalidad (Henao-Mejia et al., 2012; Heindel et al., 2017; Pafili and Roden, 2021). En algunos informes nutricionales, se ha sugerido que las dietas altas en grasa, carbohidratos y/o colesterol son las principales causas de EHGNA. Aunque muchos pacientes con EHGNA muestran obesidad y/o insulinoresistencia, no todos los pacientes presentan estas características, pudiendo desarrollar la enfermedad de manera sub-clínica (Trovato et al., 2014).

La patogénesis de la EHGNA está estrechamente relacionada con las anomalías mitocondriales inducidas por la lipotoxicidad, que sensibilizan el hígado a otras agresiones proinflamatorias, como el aumento de la peroxidación lipídica, de la generación de ROS y la activación de los inflamasomas. Los inflamasomas son complejos citoplasmáticos multiproteicos. Su función es detectar y responder a sustancias que se liberan durante infecciones, daños en tejidos o desequilibrios metabólicos. Son sensores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) endógenos o exógenos o de patrones moleculares asociados a daños (DAMP), lo que conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias efectoras como la pro-IL-1 β y la pro-IL-18. La mayoría de los DAMP desencadenan la generación de ROS, que se sabe que activan el inflamasoma NLRP3 (receptor tipo NOD de la familia 3 que contiene un dominio pirina). La producción de IL-1 β e IL-18 dependiente del inflamasoma puede desempeñar un papel importante en la progresión de la EHGNA (Henao-Mejia et al., 2012).

Programación de hígado graso

La obesidad materna predispone en los hijos a desarrollar obesidad y EHGNA durante la infancia y adolescencia (Thompson, 2020). La nutrición alterada en la primera infancia, además de aumentar el riesgo de desarrollar obesidad, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares en la descendencia, se asocia con un mayor riesgo para el desarrollo de EHGNA. En las últimas décadas ha habido una creciente evidencia que sugiere que un ambiente obesogénico materno puede contribuir a la obesidad y el síndrome metabólico de la descendencia (Drake and Seckl, 2011; Fernandez-Twinn et al., 2019; Lindsay et al., 2019). Los modelos animales han demostrado que la descendencia de las madres con obesidad inducida por la dieta desarrollan complicaciones metabólicas, incluida la EHGNA (Alfaradhi et al., 2014; Thompson, 2020).

Los mecanismos implicados en la programación de EHGNA son la sobreacumulación lipídica en el hígado, la disfunción mitocondrial generando estrés oxidativo y la secreción de citoquinas proinflamatorias (Thompson, 2020). Una característica importante de EHGNA es la acumulación de lípidos. La acumulación de ácidos grasos ocurre cuando la absorción de ácidos grasos y la síntesis exceden la capacidad oxidativa de los hepatocitos. La acumulación de grasa en el hígado fetal puede

originarse directamente de la transferencia de lípidos de la madre y representa un "primer desafío" durante el desarrollo de la vida temprana (Stewart et al., 2013; Purcell and Glastras, 2023). Por ellos, la alteración de la expresión y actividad de los transportadores de lípidos en los hepatocitos, como LPL y CD36, están alterados en los hígados de adultos y fetos que desarrollan EHGNA. Las mitocondrias son esenciales para la generación de energía y son el sitio principal para la β -oxidación de ácidos grasos. En EHGNA, la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos aumenta para adaptarse a la acumulación excesiva de grasa hepática y, a su vez, conduce a un aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Alfaradhi et al., 2014; Lindsay et al., 2019). Es por eso que la expresión y actividad de las enzimas de oxidación como Aco, Cpt-1, Acaa2, Hadha y Cyp4a1 se encuentran alteradas en hígados de adultos y fetos que desarrollan EHGNA. La EHGNA está relacionada con la obesidad y la diabetes tipo 2, patologías que están asociadas con la inflamación crónica de bajo grado. La obesidad produce secreción de citoquinas y adipocinas derivada del tejido adiposo e infiltración progresiva de células inmunes innatas como los macrófagos, que contribuyen a un estado de inflamación local y sistémica. Este perfil inflamatorio alterado puede tener efectos periféricos en el hígado y, durante el embarazo, puede aumentar la inflamación placentaria y fetal (Goldstein et al., 2020). Por otro lado, el receptor de hidrocarburos aromáticos policíclicos (AHR), puede activarse mediante por metabolitos dietarios, endócrinos y contaminantes nocivos, y por ello está implicado en la respuesta coordinada a diversos estresores. Este receptor induce la respuesta de biotransformación de metabolitos nocivos en otros excretables.

El hígado entonces coordina el metabolismo de lípidos con la biotransformación de metabolitos perjudiciales endógenos y exógenos, entre ellos ROS, por lo que alteraciones en su función tiene resultados deletéreos para el organismo.

PLACENTA

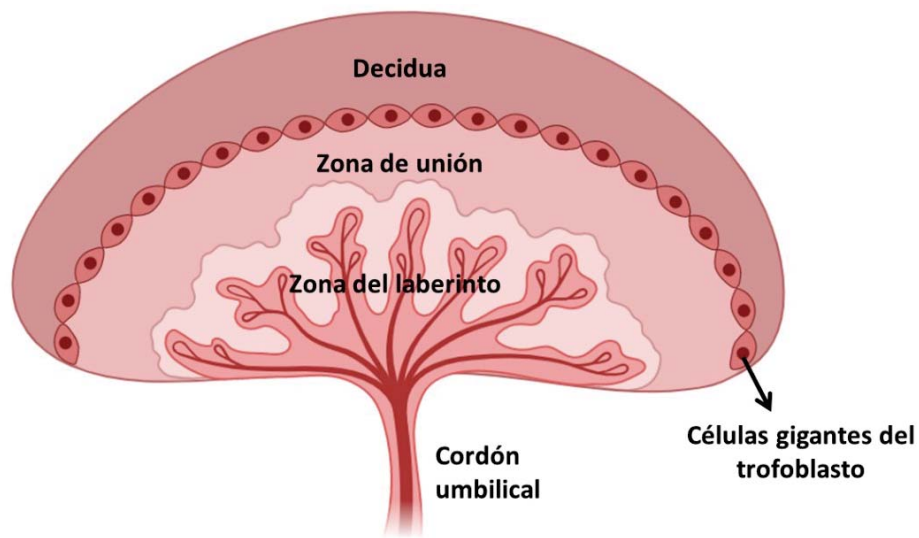
La placenta es un órgano transitorio que facilita el intercambio de sustancias entre la madre y el feto, proporcionando alimento, oxígeno y es una barrera de protección frente al sistema inmune materno, microorganismos infecciosos y potenciales teratógenos (Fowden et al., 2020; Jawerbaum and White, 2017; Kramer et al., 2023). Es por ello que es un órgano clave para la nutrición del feto en desarrollo. La placenta censa el entorno intrauterino y las necesidades fetales, y responde para proporcionar los nutrientes desde la madre al feto. Además de su función nutricional, la placenta también ejerce un papel regulador en el ambiente intrauterino y en el desarrollo fetal.

En los primeros estadios del desarrollo, la nutrición embrionaria ocurre mediante difusión simple de sustancias de célula a célula, para luego depender del saco vitelino. El saco vitelino será funcional hasta que lo reemplace la placenta. La prevalencia de la función del saco vitelino depende de la especie. En la rata, el reemplazo ocurre a mediados de la preñez, mientras que en humanos a fines del primer trimestre de embarazo (Ornoy and Miller, 2023). Una vez establecida la placenta, el embrión en desarrollo se nutre y respira a través de la circulación materno-fetal. La sangre oxigenada y rica en nutrientes llega al embrión por la vena umbilical, provee al mismo y luego retorna por las arterias umbilicales a la circulación materna. (Furukawa et al., 2019).

A partir del evento implantatorio, el trofoblasto invade la decidua materna penetrando la pared uterina. En la rata, esto da lugar a la formación de vellosidades cubiertas de trofoblastos, que penetran en la pared uterina creando ramificaciones y formando de esta manera el laberinto. Algunos trofoblastos se separan de la vellosidad (trofoblastos extravellosos) e invaden el endometrio y el miometrio únicamente de manera intersticial. Esta invasión abre espacios en la pared uterina, donde los sinusoides arteriales maternos vuelcan su contenido una vez establecida e iniciada la función placentaria (Silva and Serakides, 2016). En la rata, la placenta comienza a ser funcional a partir del día 12-13 de preñez, y la nutrición, hasta el momento histotrófica, pasa a ser hemotrófica. Los espacios abiertos son los lugares donde se establecerá el transporte de nutrientes y sustancias entre la circulación materna y la fetal (Ornoy and Miller, 2023).

La estructura de la placenta varía entre especies, pero en todas, las vellosidades placentarias son las principales áreas de intercambio materno-fetal. Las placentas, tanto

de ratas como de humanos, se clasifican anatómicamente en tipos discoides (vellosidades agrupadas en un área circular u ovalada) y hemocoriales (en contacto directo del epitelio coriónico con el lecho sanguíneo materno) (Furukawa et al., 2014). Las vellosidades de la placenta humana poseen una sola capa sincicial en lugar de tres, estableciendo así la placenta hemomonocorial: vellosidades formadas por la vasculatura fetal rodeada por una sola capa de sinciciotrofoblasto que se encuentra en contacto con la sangre materna y que presenta microvellosidades en la membrana plasmática aumentando su superficie de intercambio (Silva and Serakides, 2016). Por otro lado, en la placenta de rata, de estructura hemotricorial, las vellosidades adquieren una disposición en forma de laberinto para maximizar la eficiencia de transporte (Furukawa et al., 2019).



Esquema 6: Estructura de la placenta de rata.

La placenta madura de rata consta de diversas regiones, pudiéndose diferenciar anatómicamente dos zonas fetales y una zona materna: la parte fetal está compuesta por la zona del laberinto y la zona de unión, y la parte materna está compuesta por la decidua (**Esquema 6**) (Furukawa et al., 2019; Silva and Serakides, 2016). Hacia la cara fetal se encuentra la placa coriónica o placa basal, formada por tejido conectivo derivado del corion, por dentro de la misma corren las venas y arterias fetales de forma radial, encontrándose con una sola vena y dos arterias en el cordón umbilical. Estas venas y arterias radiales emiten prolongaciones por dentro de las vellosidades que forman la más abundante región placentaria: **el laberinto**. Éste está compuesto por las vellosidades que

se ramifican en forma similar a un laberinto. Se considera a la placenta de rata más eficiente que la humana debido a la forma laberíntica que adquieren sus vellosidades, lo que la hace tener más superficie de contacto. Cada vellosidad está compuesta por tres capas celulares (placenta tricorial) que envuelven a las arterias y venas fetales y que están en contacto con la sangre materna volcada en los espacios maternos durante la invasión trofoblástica. La primera monocapa celular, que está en contacto directo con la sangre materna, es de citotrofoblastos mononucleares que forman canales por donde la sangre materna entra hasta la segunda y tercera capa. Estas dos monocapas son sinciciales y poseen comunicación entre ambas mediante uniones estrechas que las relacionan. Por otra parte, la capa sincicial intermedia posee invaginaciones en la membrana que está en contacto con la capa citotrofoblástica. Ahí se crean espacios donde la sangre materna entra en contacto con la capa sincicial. Así, estas tres capas funcionan como una sola, dado que la primera capa de citotrofoblastos es discontinua y la segunda capa se une a la tercera por medio de uniones estrechas (Furukawa et al., 2019; Georgiades et al., 2002). La continuidad de la capa de sincitiotrofoblasto proporciona una barrera placentaria. El pasaje de nutrientes, el intercambio de gases y sustancias se realiza en las ramificaciones más delgadas ya que es ahí donde el endotelio de venas y arterias fetales es más permeable, debido a la delgadez de la pared endotelial y a la presencia de poros. Las vellosidades principales contienen venas y arterias rodeadas de musculatura lisa, en donde no hay transporte de sustancias a través de las mismas, sino que su principal rol es el de sostén de las vellosidades (Furukawa et al., 2019).

A continuación del laberinto se ubica **la zona de unión**, una región de citotrofoblastos especializados en producción de hormonas y en reserva de glucógeno. Esta zona está constituida por trofoblastos, pero no posee circulación fetal. Los trofoblastos de esta región tienen alta capacidad invasiva y son productores de hormonas, además de tener acceso directo a la sangre materna. La zona de unión es un sitio de producción de esteroides y hormonas peptídicas, que juegan un papel importante en el mantenimiento de la preñez (Furukawa et al., 2019). Cuatro linajes de células del trofoblasto se diferencian a partir de células progenitoras de trofoblastos y constituyen esta zona: 1) células gigantes del trofoblasto, 2) espongiotrofoblastos, 3) células de glucógeno y 4) células trofoblásticas invasoras (Soares et al., 2012). Las células gigantes del trofoblasto se encuentran bordeando la zona de unión de la placenta formando una capa discontinua. Son las principales células endocrinas de la placenta y poseen capacidad

invasiva. Además, existen subpoblaciones de este tipo celular en otros lugares específicos dentro de la placenta (Georgiades et al., 2002). Los espongiotrofoblastos son los principales constituyentes de la zona de unión y también contribuyen a la función endocrina de la placenta. Las células de glucógeno aparecen alrededor del día 13 de preñez. Poseen la capacidad de almacenar glucógeno y de invadir la arteria uterina materna produciendo modificaciones en los componentes de la pared vascular y aumentando el flujo sanguíneo (Georgiades et al., 2002). Las células trofoblásticas invasoras migran desde la zona de unión y entran en el compartimento de la zona mesometrial del útero, donde penetran y rodean las arterias espiraladas uterinas, jugando un papel clave en su remodelación. (Furukawa et al., 2019; Malassine et al., 2003).

Por último, la **decidua** constituye la cara materna de la placenta y se encuentra limitado por las células trofoblásticas y el miometrio. Esta región es progresivamente invadida por las células gigantes del trofoblasto y las células de glucógeno, lo que está controlado por varias proteínas inhibitoras que expresa la decidua (Furukawa et al., 2019; Silva and Serakides, 2016). La decidua tiene diversas funciones: actúa como barrera física para aislar el blastocisto implantante del tejido materno, es fuente de nutrientes como resultado de la acumulación de glucógeno y/o lípidos, y es productora de hormonas y mediadores de la señalización, como la prolactina, prostaglandinas, esteroides, relaxinas, entre otras (“Implantation, Maternofetal Exchange and Vascular Relationships,” 2008).

La placenta secreta algunas de las hormonas necesarias para el mantenimiento de la preñez. Si bien en la preñez murina se detecta expresión de las enzimas que participan de la esteroidogénesis placentaria, la principal síntesis de estrógeno y progesterona la realiza el cuerpo lúteo. Hasta mediados de la gestación es la hipófisis la que secreta prolactina para sostener la función endócrina del cuerpo lúteo y así mantener la función ovárica, pero luego es la placenta la que sintetiza y secreta las hormonas tipo prolactina para estimular dicha función. Desde el principio de la gestación murina, se sintetiza la hormona lactógeno placentaria I y hacia mediados de la gestación se empieza a sintetizar la hormona lactógeno placentaria II, cuyos niveles se mantienen elevados hasta el final de la preñez. Estas dos hormonas, uniéndose a los mismos receptores que la prolactina, mantienen la función esteroidogénica del cuerpo lúteo (Rothchild, 1981; Forsyth, 2009).

Placenta y programación metabólica.

La placenta, lejos de ser únicamente un órgano pasivo para la transferencia de nutrientes y oxígeno entre la madre y el feto, desempeña un papel dinámico y adaptativo en condiciones intrauterinas adversas. Diversas investigaciones indican que la placenta puede modificar su estructura y función para optimizar el flujo de sustratos esenciales, influyendo así en el crecimiento y desarrollo fetal. Este flujo, a su vez, programa los sistemas fisiológicos a nivel epigenético, celular, tisular, orgánico y sistémico, y deficiencias en estos sistemas pueden inducir cambios estructurales y funcionales permanentes, predisponiendo a la descendencia a desarrollar enfermedades en la edad adulta (Sferruzzi-Perri and Camm, 2016; Jawerbaum and White, 2017; Kramer et al., 2023).

Se ha reportado que diversos factores maternos afectan la función placentaria y el desarrollo fetal, como sobrepeso u obesidad por una alimentación con exceso de grasas, de azúcares o de ambos, dietas bajas en proteínas, hipoxia, tabaquismo, alcoholismo, anemia, hipertensión, entre otras (Burd et al., 2007; Tissot Van Patot et al., 2010; Vaughan et al., 2012; Mazzucco et al., 2013a; Suter and Aagaard, 2020). En algunos modelos se han encontrado alteraciones en los pesos placentarios y fetales, mostrando que los efectos específicos pueden depender del tipo y la gravedad del desafío ambiental, así como del momento y tiempo de exposición durante la gestación. En particular, se ha observado que dietas con exceso de grasas administrada durante los meses previos y durante el embarazo tiene efectos variables sobre el crecimiento fetoplacentario en ratones y ratas. Las dietas con un contenido de grasa de 2,5 a 6 veces mayor que el alimento de control tienden a aumentar el peso fetal, a menudo en ausencia de cambios en el peso de la placenta (Li et al., 2013a; Mazzucco et al., 2013a; Dahlhoff et al., 2014; D. W. Kim et al., 2014; Wang et al., 2015), mientras que las que poseen mayor porcentaje de grasas tienden a disminuir el peso fetal y placentario (Hayes et al., 2012; King et al., 2013; C. Reynolds et al., 2015; Wu et al., 2015; Bellisario et al., 2015; Sferruzzi-Perri and Camm, 2016).

El ambiente materno alterado puede ocasionar alteraciones en la estructura de la placenta. En la rata, tanto la zona de unión como la zona del laberinto puede verse afectada por el entorno materno. De la misma manera que el peso placentario, dependiendo del estresor y del tiempo de exposición se altera de manera diferencial la estructura

placentaria. Principalmente, es la zona de unión la que disminuye en primera instancia frente a alguna alteración, como es una dieta alta en grasas, y también en modelos de desnutrición, preservando la función de transporte placentario, incluso a expensas de la formación de la región endocrina placentaria, para optimizar la entrega de sustrato al feto en determinadas fases de desarrollo (Roberts et al., 2001; Coan et al., 2010; Mark et al., 2011; Sferruzzi-Perri et al., 2011; Sferruzzi-Perri and Camm, 2016).

Además de su peso y su estructura, los factores maternos pueden afectar al metabolismo lipídico placentario y generar inflamación crónica placentaria, lo que podría estar perjudicando la función placentaria, el transporte de nutrientes y el correcto desarrollo y crecimiento del feto (Louwagie et al., 2018; Goldstein et al., 2020). Algunas alteraciones ocasionadas por un ambiente intrauterino adverso, principalmente por obesidad materna, serán explicadas en las siguientes secciones y en la discusión con los resultados de la presente tesis.

Metabolismo placentario de ácidos grasos.

La placenta es capaz de recibir, acumular y transportar los lípidos desde la sangre materna al feto (Herrera and Desoye, 2016; Duttaroy and Basak, 2022). Los primeros días de la gestación, la nutrición es histotrófica (el embrión se alimenta directamente de los nutrientes y sustratos disponibles en el útero materno) y, al establecerse la placenta funcional al día 12 gestacional, la nutrición pasa a ser hemotrófica (el embrión y el feto se nutren de los elementos aportados por la sangre materna que circula por la placenta) (Soares et al., 2012; Ornoy and Miller, 2023).

Tráfico de ácidos grasos en la placenta

Para el transporte de nutrientes hacia el feto, la placenta exhibe una expresión específica de transportadores en la membrana del trofoblasto. Los ácidos grasos son los nutrientes lipídicos que pueden ser internalizados desde la circulación materna hacia el feto. Cuando los mismos están en circulación en su forma libre (unidos a albúmina), pueden atravesar la barrera placentaria por difusión simple o en forma facilitada por

proteínas transportadoras de ácidos grasos presentes en la placenta humana y de rata. Aunque la mayor parte de los lípidos presentes en la circulación materna se encuentran como triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol, dentro de lipoproteínas como VLDL, formadas en el hígado, o quilomicrones, formados en el intestino (Lewis and Desoye, 2017; Duttaroy and Basak, 2022).

La placenta posee múltiples receptores y enzimas que le permiten metabolizar las lipoproteínas de circulación materna e incorporar su contenido. Tanto la LPL como la lipasa endotelial (LE), también nombrada Lipasa G (LIPG), hidrolizan las lipoproteínas, triglicéridos y fosfolípidos transportados en la sangre materna, seguido de la liberación de los ácidos grasos y su posterior internalización por el trofoblasto (Barrett et al., 2014). Los ácidos grasos no esterificados se internalizan en el trofoblasto a través de la difusión facilitada por proteínas transmembrana como FAT/CD36, las proteínas de unión a ácidos grasos de la membrana plasmática placentaria (p-FABPm) y las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATPs). Una vez dentro del trofoblasto, los ácidos grasos también pueden unirse a las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) que se localizan en el citoplasma y son las responsables del transporte de los ácidos grasos a través de citosol hasta los sitios donde serán oxidados o esterificados. En los trofoblastos se expresan FABP1, FABP3, FABP4 y FABP5 (Lager and Powell, 2012; Myatt and Maloyan, 2016; Lewis et al., 2018; Duttaroy and Basak, 2022). Dichos lípidos pueden ser utilizados por la placenta como fuente de energía o ser nuevamente hidrolizados para la obtención de los ácidos grasos que son transferidos a circulación fetal (donde estarán en forma de ácidos grasos libres o formando parte de lipoproteínas fetales) (Lager and Powell, 2012; Lewis et al., 2018). La obesidad materna puede alterar el contenido lipídico y la expresión de ciertas proteínas de unión a ácidos grasos en los trofoblastos, lo que podría tener implicaciones significativas para el desarrollo fetal y la salud neonatal.

Almacenamiento de lípidos

Los trofoblastos son únicos en su regulación del transporte de lípidos de un organismo (la madre) hacia otro (feto). Los lípidos se almacenan en la placenta tanto humana como de la rata. Dentro del trofoblasto, los ácidos grasos se almacenan en gotas lipídicas re-esterificados, para luego ser movilizados y transportados al feto. Las gotas lipídicas están recubiertas y mantenidas por proteínas asociadas a las gotas lipídicas,

siendo algunas de ellas las perilipinas, y específicamente PLIN2 y PLIN3 se expresan en la placenta, aunque PLIN2 es esencial para la acumulación lipídica (Bildirici et al., 2018). Estas proteínas de la periferia de las gotas son modificadas mediante señales endocrinas, paracrinas y autocrinas para permitir o no la salida y/o la entrada de nuevos lípidos a la gota. De esta manera, cuando la célula lo necesita, puede hacer uso de los lípidos almacenados como recurso estructural, mediadores intracelulares, sustrato energético o transportarlos al feto (Duttaroy and Basak, 2022). La desregulación en el tráfico de lípidos placentarios puede tener consecuencias importantes para la biología del trofoblasto y el suministro crítico de nutrientes hacia el feto (Kozlosky et al., 2022; Myatt and Maloyan, 2016). El suministro excesivo de ácidos grasos libres, junto con una sobreacumulación de lípidos, puede predisponer a los trofoblastos a una excesiva lipoperoxidación, lo que puede alterar la integridad de la membrana y las funciones metabólicas, dañar al ADN, generando estrés del retículo endoplasmático, inflamación, disfunción mitocondrial, y daño celular (Myatt and Maloyan, 2016; Dimasuay et al., 2016; Louwagie et al., 2018; Fowden et al., 2020).

β-oxidación de ácidos grasos

La actividad metabólica de la placenta, especialmente del sinsiciotrofoblasto, es considerable, con alto consumo de oxígeno y producción de energía principalmente derivada de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. Aunque históricamente se consideraba que la glucosa era el principal sustrato energético para la placenta y el feto, investigaciones recientes han demostrado que la placenta puede utilizar ácidos grasos para la generación de energía mediante la oxidación de ácidos grasos de cadena larga (Myatt and Maloyan, 2016; Duttaroy and Basak, 2022). La β-oxidación es una fuente de energía clave para el metabolismo placentario. Las enzimas claves para la β-oxidación tanto en la mitocondria como en el peroxisoma, CPT-1 y ACO, se expresan en el trofoblasto, y algunos han reportado que mujeres con obesidad y con diabetes mellitus gestacional presentaban una menor capacidad de oxidación de los ácidos grasos (Visiedo et al., 2013; Calabuig-Navarro et al., 2017; Kelly et al., 2020). Los ácidos grasos de cadena larga necesarios para la oxidación de ácidos grasos placentaria son abundantes en el plasma materno al final de la gestación, pero aumentan notablemente con la obesidad y se cree que desempeñan un papel en la resistencia a la insulina (Gulecoglu Onem et al.,

2021). Las deficiencias en la placenta de las enzimas implicadas en la oxidación de ácidos grasos conducen a la acumulación de metabolitos tóxicos (Myatt and Maloyan, 2016). Además, han observado un aumento de la síntesis de lípidos y la producción de energía, y alteración de la capacidad antioxidante en la placenta de mujeres con obesidad normoglucémicas en comparación con las de peso normal. Estos hallazgos, junto con los datos que demuestran un mayor contenido lipídico y una menor capacidad antioxidante en los trofoblastos cultivados de mujeres obesas, concuerdan con la propuesta de que la obesidad materna está asociada a la lipotoxicidad placentaria y a alteraciones en el metabolismo lipídico y tráfico de lípidos hacia el feto (Kelly et al., 2020).

Placenta e inflamación

Durante el embarazo, el estado proinflamatorio, junto con un aumento de la masa grasa, resistencia a la insulina e hiperlipidemia leve, se ve exacerbado en mujeres con sobrepeso u obesidad, observándose alteraciones en la función placentaria, con consecuencias perjudiciales en el metabolismo fetal y la programación metabólica del individuo en desarrollo (Mazzucco et al., 2013a; Kelly et al., 2020; Pérez-Pérez et al., 2020; Scheidl et al., 2023a). El estado proinflamatorio asociado con el sobrepeso y la obesidad contribuye a estas alteraciones, afectando tanto la formación de la placenta como la permeabilidad de la vasculatura uterina y fetal (Kelly et al., 2020; Scheidl et al., 2023a). Esto se refleja en mayores concentraciones de citocinas inflamatorias tanto en la circulación materna como en la placenta. Esta inflamación placentaria puede ser desencadenada por diversas causas, como endotoxinas, lípidos y especies reactivas de oxígeno, y puede llevar a una disfunción placentaria generalizada, incluida una mayor liberación de ácidos grasos libres a la circulación fetal (Scheidl et al., 2023a).

La inflamación crónica de bajo grado en mujeres obesas antes del embarazo inicia una cascada de acontecimientos que conducen a un entorno inflamatorio en el útero (Goldstein et al., 2020). Además, se ha demostrado una acumulación significativa de subconjuntos de macrófagos en placentas de pacientes obesas, lo que da lugar a la producción de citocinas proinflamatorias y adipocinas, como IL-6, IL-1 β , leptina, TNF- α , la proteína quimiotáctica de monocitos 1 y el TLR4 (Zhu et al., 2010; Lager et al., 2011; Myatt and Maloyan, 2016; Goldstein et al., 2020). La inflamación placentaria

incontrolada conduce al deterioro de la función placentaria general, como el aumento de la liberación de ácidos grasos libres (AGL) a la circulación fetal y estrés oxidativo, lo que se espera que altere el crecimiento y el desarrollo del feto (Kelly et al., 2020; Scheidl et al., 2023a). Los ácidos grasos saturados, como el palmitato y el estearato, activan vías de señalización proinflamatorias que pueden afectar la función mitocondrial y contribuir a la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en la placenta (Myatt and Maloyan, 2016; Scheidl et al., 2023a).

Dimorfismo sexual

Es evidente que los fetos masculinos y femeninos muestran respuestas distintas ante un entorno intrauterino adverso, lo que puede influir en su susceptibilidad a desarrollar enfermedades en la vida adulta. Esta diferencia en la incidencia de enfermedades se manifiesta incluso en embarazos y desarrollos considerados "normales", lo que refleja un efecto de dimorfismo sexual (Clifton, 2010). En la actualidad se sigue investigando acerca del dimorfismo sexual. Autores han evidenciado que los fetos masculinos tienden a crecer más rápido y ser de mayor tamaño en comparación con los femeninos, aunque presentan un mayor riesgo de complicaciones durante el embarazo, como parto prematuro, rotura prematura de membranas, placenta previa y retraso en el desarrollo pulmonar. Además, tienen una mayor incidencia de macrosomía con intolerancia materna a la glucosa y un mayor riesgo de mortinatos tardíos asociados a la diabetes pregestacional. Por otro lado, los recién nacidos de sexo femenino parecen adaptarse más fácilmente a la vida fuera del útero, incluso cuando nacen en un estado muy prematuro, posiblemente debido a adaptaciones intrauterinas a un entorno adverso antes del parto. Hay autores que sugieren que el feto masculino "vive peligrosamente en el útero" para maximizar su crecimiento potencial, pero esto conlleva un alto riesgo en caso de eventos adversos adicionales. Es probable que exista una compleja interacción entre el entorno adverso de la obesidad y el sexo fetal (Eriksson et al., 2010; Myatt and Maloyan, 2016; Yu et al., 2021).

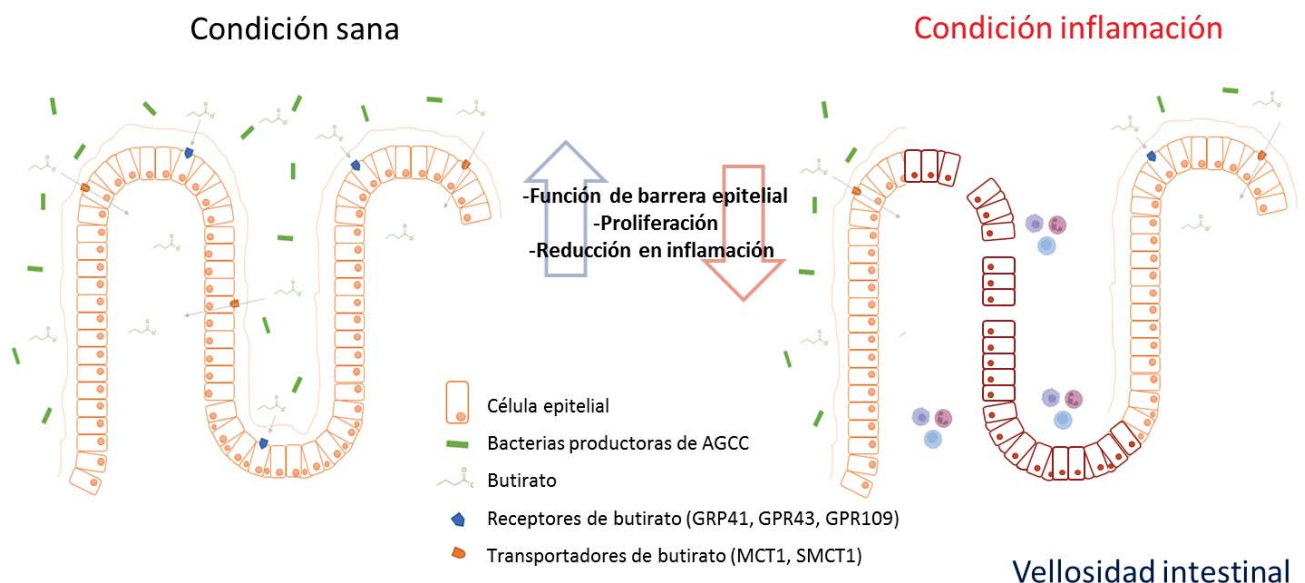
La placenta, como tejido fetal, exhibe dimorfismo sexual en términos de expresión génica. Se han identificado perfiles de expresión génica dimórficos en la placenta humana, especialmente en genes relacionados con la inmunidad, que se expresan a niveles

más altos en la placenta femenina que en la masculina. Además, la expresión génica en la placenta responde al estado inflamatorio materno de manera dependiente del sexo (Myatt and Maloyan, 2016). Los cambios en la dieta también pueden afectar la expresión génica en la placenta, con una tendencia a una mayor expresión en los genes de la placenta femenina en comparación con la masculina. Además, se ha observado que la placenta masculina presenta una mayor expresión de ciertos genes, como el receptor tipo Toll 4 (TLR4), y produce más TNF- α en respuesta a lipopolisacárido bacteriano (LPS), lo que puede contribuir a la propensión al parto prematuro en fetos masculinos (Mao et al., 2010; Myatt and Maloyan, 2016).

Los mecanismos detrás del dimorfismo sexual en la placenta en el contexto de la obesidad aún no se comprenden completamente, pero se han asociado diferencias sexuales con niveles plasmáticos de hormonas esteroideas. Se sabe que las mujeres con preeclampsia tienen niveles plasmáticos de testosterona aumentados en comparación con los de las embarazadas sanas, con niveles significativamente más altos en los embarazos preeclámpicos de fetos masculinos que femeninos (Sathishkumar et al., 2012). Entonces, existe una compleja interacción entre el sexo fetal, los niveles hormonales y los factores ambientales, como la obesidad materna, que pueden influir en la función y el desarrollo de la placenta (Myatt and Maloyan, 2016; Duttaroy and Basak, 2022). Por este motivo, cada vez más grupos de investigación estudian tanto las placentas como los distintos tejidos, teniendo en cuenta el sexo fetal como una variable biológica relevante.

MICROBIOTA INTESTINAL Y ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA (AGCC).

Como mencionamos anteriormente, la obesidad es multifactorial y deriva de una compleja interacción entre los cambios ambientales y la predisposición genética (Blüher, 2019). En este sentido, cobra relevancia el papel que desempeña la microbiota intestinal en la patogénesis de la obesidad, dado que podría representar el vínculo causal entre los factores ambientales y la aparición de la obesidad. El conjunto de microorganismos que constituyen la microbiota intestinal desempeña un papel clave en la regulación de la homeostasis energética y la secreción de hormonas (Fava et al., 2019). Se sabe que, tanto en pacientes con obesidad, como en modelos animales de obesidad, hay una disbiosis, un desequilibrio de la microbiota presentando alteraciones en la composición de microorganismos en la misma, que induce alteraciones metabólicas, inflamatorias e inmunitarias tanto a nivel local como sistémico, en gran parte como consecuencia del deterioro de la función de barrera intestinal (Parada Venegas et al., 2019). De esta forma, se favorece el pasaje de sustancias proinflamatorias y potenciales patógenos a la circulación, afectando así a otros tejidos (**Esquema 7**) (Fava et al., 2019).



Esquema 7: Representación gráfica en de las vellosidades intestinales en condiciones sanas y condiciones de inflamación, como la obesidad.

Entre los factores que influyen a la microbiota intestinal, los compuestos de la dieta afectan al crecimiento y metabolismo de las bacterias intestinales, ya que una de las principales funciones de la microbiota intestinal es la fermentación de nutrientes. Dentro de los productos de fermentación, se encuentran los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), siendo los más abundantes acetato, propionato y butirato. Los AGCC son pequeños metabolitos orgánicos producidos por la fermentación de las fibras alimentarias y el almidón resistente, que presenta numerosos efectos benéficos en el metabolismo energético, la homeostasis intestinal y la regulación de la respuesta inmunitaria (Fava et al., 2019). Se ha observado una alterada producción de AGCC en la obesidad y las enfermedades metabólicas (McNabney and Henagan, 2017; Serena Coppola et al., 2021). Además, se ha reportado que una dieta occidental rica en grasas y azúcares altera la composición y la actividad metabólica de la microbiota intestinal de forma lineal dosis-respuesta, alcanzando la disbiosis significativa y perjudicial en un tiempo medio de 3,5 días. Como resultado de esta disbiosis, se disminuye la concentración de bacterias productoras de AGCC resultando en menores concentraciones de AGCC en el tracto intestinal (Carmody et al., 2015). La microbiota es altamente sensible a diversos factores externos, y su equilibrio puede alterarse con facilidad; sin embargo, su restauración resulta mucho más compleja y, en muchos casos, incompleta (Palleja et al., 2018). Es por esto que diversos grupos de investigación se enfocaron en el papel de los AGCC en el contexto de la obesidad y distintos desórdenes metabólicos, para contribuir en el estudio del eje dieta-microbiota intestinal-salud del huésped (McNabney and Henagan, 2017; Parada Venegas et al., 2019; Serena Coppola et al., 2021).

El butirato

El ácido butírico o butirato es un AGCC que está compuesto por 4 carbonos y su fórmula molecular es $C_4H_8O_2$. Entre los AGCC, el butirato es el que tiene un mayor efecto nutricional dado que representa el 70% de la energía que necesitan los colonocitos. Además, el butirato, ingresado a la célula a través de transportadores específicos, actúa como molécula de señalización inhibiendo la actividad de la histona deacetilasa (HDAC). Además, puede actuar como ligando para los receptores de AGCC con gran afinidad, mediante los que desencadena señales que resultan en la inhibición de la transcripción inducida por el factor nuclear NF κ B y el incremento en la transcripción de proteínas de

las uniones estrechas y de incretinas, entre otros efectos. La inhibición de la síntesis de citoquinas proinflamatorias, junto al incremento de la expresión de proteínas de unión estrecha, promueven la función de barrera de las células epiteliales del intestino, manteniendo la homeostasis intestinal (Parada Venegas et al., 2019; Serena Coppola et al., 2021; Mayorga-Ramos et al., 2022; Anachad et al., 2023).

La producción de AGCC se atribuye a una variedad de microorganismos presentes en el intestino, incluidos los filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia*. Los miembros del filo *Firmicutes*, en particular la clase *Clostridia*, se consideran los productores más eficientes de butirato, siendo algunos ejemplos *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium leptum*, *Eubacterium rectale* y *Roseburia spp.* Dentro de los otros filos, incluido *Bacteroidetes*, se encuentran también bacterias productoras de butirato. Los estudios de la microbiota intestinal son cada vez más frecuentes y se suele utilizar el cociente *Firmicutes:Bacteroidetes* como índice de equilibrio microbiano. Un cociente alto está asociado a sobrepeso y obesidad (Louis and Flint, 2009; Vital et al., 2014; Serena Coppola et al., 2021; Mayorga-Ramos et al., 2022). A pesar de esto, la composición de la microbiota intestinal es única para cada individuo y todavía no se ha establecido una microbiota de referencia, siendo que está influenciada por múltiples factores.

El uso de antibióticos, la vida sedentaria, el tabaco y el consumo de alcohol y alimentos con exceso de azúcares y grasas, son los principales factores que inhiben la producción de butirato a través de una modulación negativa de la microbiota intestinal. Mientras que, entre los principales factores que promueven la producción de butirato a través de una modulación positiva de la microbiota, se encuentran los prebióticos y los probióticos. Los prebióticos sirven como sustrato para la fermentación bacteriana en el colon para generar AGCC, como son el consumo de alimentos vegetales, fuente de fibra, almidón resistente y polifenoles. Los probióticos son cultivos vivos de cepas específicas de bacterias que colonizan el tracto intestinal para promover la generación de butirato y otros AGCC. Entre las fuentes alimentarias de probióticos se encuentra el yogur y los quesos fermentados (Serena Coppola et al., 2021). Los beneficios de suplementar con prebióticos y probióticos en la salud del individuo ha sido muy estudiado en los últimos años, y ha cobrado cada vez más relevancia el uso directamente de los AGCC (Serena Coppola et al., 2021; Anachad et al., 2023). En la presente tesis, el rol que cumplen los AGCC en la patogénesis del sobrepeso y la obesidad fue de nuestro interés. El butirato

ha sido muy estudiado por su potencial para el tratamiento de la obesidad y las comorbilidades metabólicas relacionadas y se ha asociado una menor abundancia de bacterias productoras de butirato en humanos con un mayor riesgo de enfermedad metabólica, lo que demuestra su fuerza en la mitigación de las alteraciones metabólicas de la obesidad (McNabney and Henagan, 2017; Serena Coppola et al., 2021; Mayorga-Ramos et al., 2022). Es por esto que fue el AGCC elegido para nuestra investigación y a continuación se detalla sus mecanismos de absorción, de acción, vías de señalización involucradas y las investigaciones de los últimos años que utilizaron al butirato como un posible agente terapéutico.

Absorción del butirato

Dentro del total de AGCC que se producen en el colon, el 20% corresponde a butirato, y del total de AGCC presentes en vena porta el butirato representa el 8%. Es la principal fuente de energía de los colonocitos y por su fácil difusión, en un primer momento se pensaba que el butirato era utilizado o excretado en su totalidad entre el eje intestino-hígado. Trabajos más recientes demostraron que en personas sanas, hay un incremento en la concentración de butirato en circulación, que corresponde al 2% del butirato producido, pudiendo así generar un efecto a nivel sistémico (Van Der Beek et al., 2015; Boets et al., 2017; Serena Coppola et al., 2021).

Al igual que otros AGCC, el butirato se absorbe fácilmente mediante difusión no iónica a través de la membrana apical de los colonocitos por su hidrofobicidad y bajo peso molecular. Sin embargo, su absorción principalmente se debe a dos transportadores: el transportador 1 de monocarboxilatos acoplado a protones (MCT1/SLC16A1) y el transportador 1 de monocarboxilatos acoplado a sodio (SMCT1/SLC5A8) (Parada Venegas et al., 2019; Serena Coppola et al., 2021; Mayorga-Ramos et al., 2022). Entre ellos, el transportador SMCT1 es el principal transportador de butirato y tiene preferencia de transporte por él frente a los otros AGCC, y participa principalmente en condiciones de baja concentración (Gupta et al., 2006; Serena Coppola et al., 2021; Mayorga-Ramos et al., 2022).

Mecanismo de acción del butirato

El butirato actúa como ligando de los receptores acoplados a proteína G (GPCR), tales como GPR43, GPR41 y GPR109A. Los receptores GPR43 y GPR41 son conocidos como receptores de ácidos grasos libres 2 (FFAR2) y 3 (FFAR3), respectivamente. Estos receptores se encuentran en diferentes tejidos, como nervios periféricos, células enteroendocrinas L y K, adipocitos blancos, células β -pancreáticas, timo y células dendríticas mieloides. Particularmente GPR43/FFAR2 se expresa en adipocitos blancos, células enteroendocrinas L, células epiteliales intestinales, células β -pancreáticas y varias células del sistema inmunitario, como las células reguladoras T (Treg) colónicas, macrófagos M2, neutrófilos, eosinófilos y mastocitos (Brown et al., 2003; C. H. Kim et al., 2014; Macia et al., 2015; Parada Venegas et al., 2019; Serena Coppola et al., 2021; Mayorga-Ramos et al., 2022).

El receptor FFAR2 puede activar tanto la vía de señalización Gi/o como la Gq, mientras que los receptores GPR109A y FFAR3 solo activan la vía Gi/o. A través de la vía Gq, se estimula la producción de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), que a su vez activan la proteína cinasa C (PKC). Esta activación desencadena una serie de respuestas intracelulares, incluyendo la activación de las cinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK-1/2) y la c-Jun cinasa terminal (JNK), que participan en procesos de proliferación celular y respuesta al estrés. Por otro lado, la activación de los receptores FFAR2 y FFAR3 cumple un rol central en la modulación de vías de señalización clave para el equilibrio inmunológico intestinal, como la de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). A través de su interacción con metabolitos derivados de la microbiota, estos receptores contribuyen a regular la respuesta a estímulos externos, favoreciendo mecanismos de resolución de la inflamación y mantenimiento de la homeostasis (Goldsmith and Dhanasekaran, 2007; Pan et al., 2018; Parada Venegas et al., 2019; Serena Coppola et al., 2021).

La activación de los receptores GPCR por el butirato en el intestino induce la secreción de las hormonas endocrinas como el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y péptido YY (PYY) (Tolhurst et al., 2012; Serena Coppola et al., 2021). El GLP-1 aumenta la secreción de insulina, y los ratones knockout (KO) de FFAR2 muestran niveles séricos de insulina disminuidos (Tolhurst et al., 2012). Por otro lado, el PYY influye en la ingesta y el gasto de energía a nivel del hipotálamo y del tronco encefálico, y los ratones KO de

FFAR3 tienen una expresión muy baja de PYY (Serena Coppola et al., 2021). En particular, la elevación de GLP-1 y PYY inducida por el butirato puede ser crucial para prevenir o tratar la obesidad y la resistencia a la insulina.

Los AGCC (principalmente el butirato) tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de las HDACs promoviendo la acetilación de histonas, lo que afecta a la regulación génica de la proliferación celular, la diferenciación y la respuesta inflamatoria, contribuyendo a la homeostasis intestinal. Las HDAC regulan las vías de la inmunidad innata, controlando la diferenciación de las células mieloides y la respuesta inflamatoria mediada por la expresión génica inducible por TLR e IFN (Parada Venegas et al., 2019; Serena Coppola et al., 2021; Mayorga-Ramos et al., 2022).

Además, el butirato también exhibe propiedades antiinflamatorias al inhibir la activación del factor de transcripción kappa B (NF- κ B), reduciendo la transcripción de citoquinas proinflamatorias. El NF- κ B desempeña un papel central en las respuestas inmunitarias e inflamatorias y que participa en la regulación transcripcional de varios genes de citocinas, como TNF e ILs. El NF- κ B puede activarse por varios estímulos, entre ellos las citocinas proinflamatorias o LPS (Segain, 2000; Serena Coppola et al., 2021).

Mediante la activación de otros factores de transcripción, incluidos STAT3 y SP1, el butirato promueve la función de barrera epitelial mediante la inducción de genes que codifican componentes de uniones estrechas (TJ), como claudinas, ocludina, cingulina, y proteínas de la zónula ocludens (ZO-1, ZO-2), reduciendo la translocación bacteriana (Wang et al., 2012; Parada Venegas et al., 2019; Serena Coppola et al., 2021).

Rol del butirato en el metabolismo hepático, la obesidad y la gestación

La obesidad está estrechamente relacionada con trastornos del metabolismo hepático, como la EHGNA. El butirato ejerce efectos beneficiosos sobre el metabolismo lipídico intestinal y hepático. Inhibe la expresión de genes clave en la biosíntesis de colesterol intestinal, contribuyendo a disminuir la hipercolesterolemia (Alvaro et al., 2008). Asimismo, promueve el transporte reverso de colesterol, facilitando su movilización desde los tejidos periféricos hacia el hígado (Du et al., 2020). También regula la secreción de lipoproteínas como quilomicrones y VLDL, reduciendo el riesgo de dislipidemias (Serena Coppola et al., 2021).

En modelos animales, la administración de butirato reduce la acumulación de lípidos hepáticos inducida por dietas ricas en grasas (Sun et al., 2019, 2018; Zhang et al., 2021). Se ha reportado que este efecto está mediado por la mejora de la función mitocondrial hepática, vía activación de PPAR- α , lo que estimula la β -oxidación de ácidos grasos (Den Besten et al., 2015; Mayorga-Ramos et al., 2022).

Además, el butirato atenúa la inflamación hepática característica de la EHGNA al disminuir la liberación de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, MCP-1, entre otras) y aumentar citocinas antiinflamatorias (IL-10, IL-4). Estos efectos pueden deberse a la inhibición de HDAC y la activación de GPCRs, como el receptor de GLP-1 (GLP-1R), cuya expresión también se incrementa con el butirato, favoreciendo la inhibición de la lipogénesis a través de la vía AMPK/ACC (Serena Coppola et al., 2021).

El butirato se conoce como un regulador clave en la modulación del metabolismo y el peso corporal. Diversos estudios sugieren que ejerce efectos beneficiosos sobre el control del peso a través de varios mecanismos fisiológicos y metabólicos, tales como la regulación de la inflamación, la mejora de la sensibilidad a la insulina, la modulación de la termogénesis y la alteración de la función intestinal (Serena Coppola et al., 2021). En los últimos años, se ha utilizado la administración de butirato para estudios pre-clínicos y clínicos como potencial terapéutico para obesidad y síndrome metabólico (Serena Coppola et al., 2021; Mayorga-Ramos et al., 2022). Se han observado mejoras en el IMC, circunferencia e índice HOMA en chicos con obesidad (S. Coppola et al., 2021), reducción de LDL y mejoras en la respuesta inflamatoria en hombres con obesidad (Cleophas et al., 2019), y reducción de la trigliceridemia, colesterolemia y hemoglobina glicosilada HbA1c en pacientes con síndrome metabólico (Hartstra et al., 2020).

Durante el embarazo, la composición de la microbiota intestinal materna sufre modificaciones significativas, influenciadas por cambios hormonales y dietéticos. Si bien en el primer trimestre se asemeja a la microbiota de mujeres no embarazadas, hacia el tercer trimestre se reduce la diversidad bacteriana y aumenta la proporción de *Actinobacteria* y *Proteobacteria*, asociadas a estados inflamatorios. Se ha observado un aumento en el número total de bacterias durante el embarazo, con una mayor proporción de *Bifidobacteria*, *Proteobacteria* y bacterias productoras de ácido láctico, junto con una disminución de aquellas que producen butirato, con propiedades antiinflamatorias (Nuriel-Ohayon et al., 2016; Ziętek et al., 2021).

Durante la gestación, los niveles de AGCC aumentan. El acetato mejora la sensibilidad a la insulina, estimula la oxidación de ácidos grasos y modula el sistema inmune fetal. El propionato tiene efectos antiobesogénicos y hepatoprotectores, además de participar en el desarrollo del sistema simpático y enteroendocrino fetal a través de los receptores GPR41 y GPR43 (Gray et al., 2017). Por su parte, el butirato inhibe la histona desacetilasa y estimula la expresión del factor de transcripción Foxp3 (proteína forkhead box P3), favoreciendo la diferenciación de células T reguladoras (Treg) y contribuyendo a la tolerancia inmunológica neonatal. Su suplementación ha demostrado reducir TNF- α e IL-1 β , mejorar el perfil lipídico y glucémico materno, y proteger la función pancreática (Yang et al., 2015; Ziętek et al., 2021).

En modelos animales, especialmente en ratas, el butirato ha demostrado tener efectos benéficos sobre la salud materna, incluyendo la modulación de la inflamación, la regulación del metabolismo energético y la protección frente a condiciones adversas como la obesidad o la resistencia a la insulina (Lin et al., 2014; Huang et al., 2022). Estos efectos se han observado tanto en la madre como en la descendencia, lo que resalta el potencial del butirato para influir en la programación metabólica temprana. La administración de butirato en modelos animales de sobrepeso o diabetes gestacional ha mostrado una mejora en la sensibilidad a la insulina, una disminución de la acumulación de grasa visceral y una modulación positiva de los perfiles lipídicos, lo que puede contribuir a un ambiente intrauterino más favorable para el desarrollo fetal (Ziętek et al., 2021; Lyu et al., 2023).

Más aun, los efectos de los AGCC también se evidencian en la programación metabólica fetal. La obesidad materna y la alteración en la proporción de AGCC favorecen el transporte placentario excesivo de glucosa y lípidos, generando estrés inflamatorio, lipogénesis fetal y acumulación de grasa, lo que contribuye al desarrollo de un fenotipo metabólicamente alterado en el neonato (Gohir et al., 2015; Wallace et al., 2019). En conjunto, estos hallazgos refuerzan la importancia de una microbiota intestinal equilibrada y una dieta adecuada durante el embarazo, tanto para la salud materna como para el desarrollo metabólico del feto (Ziętek et al., 2021).

ANTECEDENTES

Hemos desarrollado un modelo de sobrepeso materno en ratas Wistar, inducido con una dieta con exceso de grasas saturadas ofrecida de manera previa y durante la gestación y la lactancia para estudiar la programación de anomalías metabólicas en la descendencia. Observamos que el hígado de la descendencia de ratas con sobrepeso presentaba sobreacumulación lipídica, indicadores de estrés oxidativo y de un estado proinflamatorio y un aumento en marcadores de la enfermedad de hígado graso, junto con altos niveles de transaminasas circulantes (Heinecke et al., 2020; Mazzucco et al., 2016, 2013a). Además, en estos hígados observamos una falta de respuesta a la activación de PPAR α , un factor de transcripción involucrado en el catabolismo lipídico y vías antiinflamatorias y antioxidantes, a pesar que desde el destete las ratas se alimentaron con una dieta normograsa (Heinecke et al., 2020).

Por otro lado, observamos que los fetos y la descendencia de rata con sobrepeso, presentan alteraciones intestinales también relacionadas al desarrollo de la EHGNA. Hemos reportado una disminución de la expresión de proteínas de las uniones estrechas y un incremento de los niveles de citoquinas proinflamatorias consecuente con un incremento en la permeabilidad intestinal. Asimismo, encontramos alteraciones en la expresión de incretinas, en línea con una leve intolerancia a la glucosa. Estas diferencias de la expresión de incretinas, uniones estrechas y sustancias proinflamatorias podrían involucrar alteraciones en las marcas epigenéticas modificando la expresión de genes claves, alterando la barrera epitelial y la homeostasis intestinal (Heinecke et al., 2024).

Dado que evidenciamos estas anomalías en los fetos y la descendencia adulta de madres con sobrepeso, y que el butirato está en bajas concentraciones en ratas con sobrepeso, debido a una menor proporción de bacterias productoras del mismo, decidimos realizar un tratamiento con butirato en las madres durante la gestación y la lactancia para evaluar su efecto en la programación intrauterina de anomalías metabólicas en la descendencia. Además de evaluar a la descendencia, fue de nuestro interés estudiar el efecto del tratamiento en la salud metabólica de la madre, tanto en la gestación a término como al destete.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

“El sobrepeso materno induce alteraciones en el metabolismo y en la salud hepática de la rata gestante que programan anomalías metabólicas, reproductivas y hepáticas en la descendencia, anomalías que se atenúan por el tratamiento materno con butirato.”

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del sobrepeso materno inducido por una dieta rica en grasas saturadas sobre el estado metabólico y salud hepática de las ratas gestantes a los 21 días de gestación y al destete. Evaluar el efecto del sobrepeso materno sobre el metabolismo lipídico placentario a los 21 días de gestación y el estado metabólico y la salud hepática de los fetos a los 21 días de gestación y de la descendencia de 140 días de edad.

Por otro lado, decidimos evaluar si el tratamiento materno con butirato durante la gestación y lactancia previene las alteraciones maternas, placentaria, fetales y de la descendencia de rata programadas por el sobrepeso materno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos consisten en:

- 1- Estudiar el efecto del sobrepeso materno inducido por una dieta rica en grasas saturadas en ratas de 21 días de gestación:**
 - a) Estado metabólico: caracterizar a la rata gestante de 21 días en cuanto a su composición corporal de grasa y los niveles circulantes de triglicéridos, colesterol, glucosa e IL-1 β .
 - b) Salud hepática: evaluar en ratas gestantes de 21 días el contenido lipídico hepático y los niveles de ARN mensajero de enzimas del metabolismo lipídico y transportadores de lípidos hepáticos.

- c) Parámetros reproductivos: evaluar en ratas gestantes de 21 días la ganancia de peso, el número de fetos, el peso fetal y el peso placentario.
- d) Estudiar si el tratamiento materno con butirato durante la preñez atenúa las alteraciones en ratas de 21 días de gestación encontradas en los puntos **a**, **b** y **c** del presente objetivo específico.

2- Estudiar el efecto del sobrepeso materno inducido por una dieta rica en grasas saturadas en las placentas al día 21 de gestación:

- a) Evaluar el contenido lipídico, los niveles proteicos y de ARN mensajero de enzimas del metabolismo lipídico y transportadores de lípidos en las placentas al día 21 de gestación.
- b) Estudiar si el tratamiento materno con butirato durante la preñez atenúa las alteraciones en las placentas al día 21 de gestación encontradas en el punto **a** del presente objetivo específico.

3- Estudiar el efecto del sobrepeso materno inducido por una dieta rica en grasas saturadas en los fetos al día 21 de gestación:

- a) Estado metabólico: caracterizar a los fetos al día 21 de gestación en cuanto al peso y los niveles circulantes de triglicéridos, colesterol y glucosa.
- b) Salud hepática: evaluar en los fetos al día 21 de gestación la actividad transaminasa circulante (ALT), el contenido lipídico hepático y los niveles de ARN mensajero de enzimas del metabolismo lipídico y transportadores de lípidos hepáticos.
- c) Estudiar si el tratamiento materno con butirato durante la preñez atenúa las alteraciones en los fetos al día 21 de gestación encontradas en los puntos **a** y **b** del presente objetivo específico.

4- Estudiar el efecto del sobrepeso materno inducido por una dieta rica en grasas saturadas en ratas al día del destete:

- a) Estado metabólico: caracterizar a las ratas al día del destete en cuanto a su composición corporal de grasa y los niveles circulantes de triglicéridos, colesterol, glucosa e IL-1 β .

- b) Salud hepática: evaluar en ratas al día del destete el daño tisular y función hepática (la actividad de transaminasas y fosfatasa alcalina, los niveles de albumina y bilirrubina circulantes, y daño por especies reactivas del oxígeno en el hígado), el contenido lipídico hepático y los niveles de ARN mensajero de enzimas del metabolismo lipídico y transportadores de lípidos hepáticos.
- c) Estudiar si el tratamiento materno con butirato durante la preñez y la lactancia atenúa las alteraciones en ratas al día del destete encontradas en los puntos **a** y **b** del presente objetivo específico.

5- Estudiar el efecto del sobrepeso materno inducido por una dieta rica en grasas saturadas en la descendencia de 140 días de edad:

- a) Estado metabólico: caracterizar a la descendencia de 140 días de edad en cuanto a su composición corporal de grasa y los niveles circulantes de triglicéridos, colesterol y glucosa.
- b) Salud hepática: evaluar en la descendencia de 140 días de edad el daño tisular y función hepática (la actividad de transaminasas y fosfatasa alcalina, los niveles de bilirrubina circulantes, y el daño por especies reactivas del oxígeno en el hígado), el contenido lipídico hepático y los niveles de ARN mensajero de enzimas del metabolismo lipídico y transportadores de lípidos hepáticos.
- c) Evaluar los parámetros reproductivos en la descendencia de 140 días de edad, en hembras la duración del ciclo estral y en machos en longitud e índice testicular y epididimal, motilidad y recuento espermático.
- d) Estudiar si el tratamiento materno con butirato durante la preñez y la lactancia atenúa las alteraciones en la descendencia de 140 días de edad encontradas en los puntos **a**, **b** y **c** del presente objetivo específico.

3.METODOLOGÍA

3.1 Animales.

Para el desarrollo de esta tesis de doctorado, se utilizaron ratas de la cepa albino Wistar, que fueron adquiridas en el Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires y mantenidas en el bioterio del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos con libre acceso al agua y al alimento balanceado (GEPSA, Buenos Aires, Argentina). Los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12 y 12 horas respectivamente, la temperatura de 24 ± 2 °C y humedad constante. El estudio se realizó siguiendo las normas para el cuidado y uso de los animales aprobadas por la institución local (CICUAL), bajo el protocolo **n° 2210** del año 2015 y **n°4081/04** del año 2022, basada en las pautas del National Institute of Health (NIH) especificadas en “Principles of Laboratory Animal Care, NIH publication N° 85-23, revised 1985”.

3.1.1 Modelo de sobrepeso materno: diseño experimental.

Se desarrolló y estableció un modelo de sobrepeso materno para el estudio de la descendencia a nivel metabólico y el potencial efecto protector del butirato. Para esto se alimentó a las ratas hembra albino Wistar con una dieta rica en grasas saturadas, provenientes de grasa bovina (Faty, Argentina).

En la presente tesis se utilizaron dos modelos experimentales, uno en el que las ratas preñadas continuaron la gestación hasta el día 21, al cual llamaremos **modelo gestacional**, y otro en el cual se dejará nacer a la descendencia para evaluarlas en su adultez, al cual llamaremos **modelo de programación**.

Diseño experimental modelo gestacional.

Entonces, para el modelo gestacional, 30 ratas hembras de 6 semanas de edad fueron separadas en 2 grupos: 15 ratas formaron parte del **grupo control (CT)**, alimentadas durante toda su vida con una dieta comercial estándar con un contenido de 5% de lípidos; y las 15 ratas restantes formaron parte del **grupo de dieta grasa (DG)**, alimentadas con una dieta rica en grasas saturadas que consistió en la dieta comercial

estándar suplementada con un 25% de grasas saturadas de origen animal, por el agregado de grasa bovina derretida al alimento. Ambos alimentos, el de la dieta estándar y la dieta grasa, se enviaron a analizar al servicio de análisis de alimentos para el rotulado nutricional del INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial). En la **Tabla 1** se muestra la composición nutricional de las dos dietas y en la **Tabla 2** el porcentaje de calorías aportadas por cada componente dietario.

	Dieta Control (CT)	Dieta Grasa (DG)
Proteínas (g)	22	20
Carbohidratos (g)	47	43
Grasas (g)	5	26
Energía (Kcal)	321	486

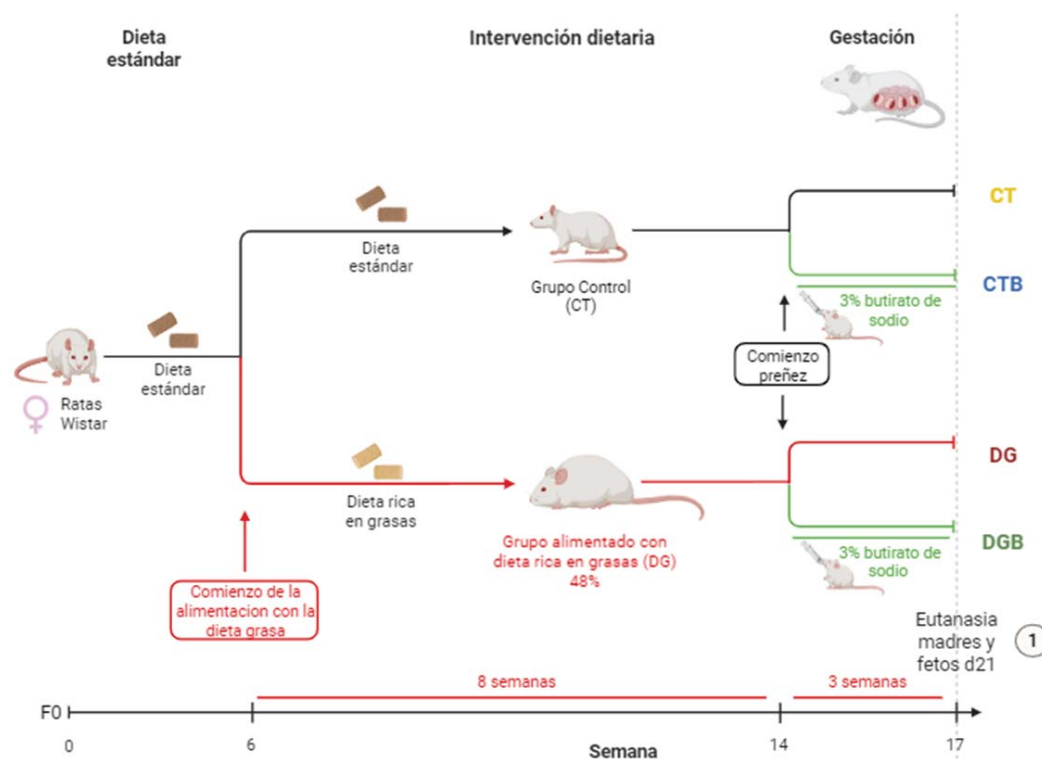
Tabla 1. Composición nutricional de los tratamientos dietarios cada 100 g de alimento.

	Dieta Control (CT)	Dieta Grasa (DG)
Proteínas (% Kcal)	27,4	16,5
Carbohidratos (% Kcal)	58,6	35,4
Grasas (% Kcal)	14,0	48,2
Energía (Kcal/100g)	321	486

Tabla 2. Porcentaje de calorías sobre el total de calorías.

Se continuó con las respectivas dietas por 8 semanas, registrando los pesos de las ratas y del consumo de alimento todas las semanas. Las ratas de ambos grupos, **CT** y **DG**, se aparearon con machos **CT** de 10 semanas de edad, alimentados durante toda su vida con una dieta comercial estándar. La observación de espermatozoides en el extendido vaginal determinó el día 1 de gestación. El 93% de las ratas se preñaron dentro de los diez días de apareo. Las ratas que no fueron preñadas dentro de los 20 días fueron excluidas del experimento. A las ratas preñadas de ambos grupos se les administró oralmente vehículo (agua, **grupo CT y DG**) o butirato de sodio 3% (SIGMA, g/100g de alimento, **grupo CTB y DGB**) diariamente durante toda la gestación. Los tratamientos dietarios continuaron a lo largo de la preñez. Esta concentración fue elegida por bibliografía, se realizó una prueba con 3 animales y se corroboró la buena tolerancia al tratamiento. Se administró butirato a ratas controles y alimentadas con dieta grasa, para poder identificar

efectos tanto positivos como potenciales efectos indeseados del butirato sobre la gestante y/o su descendencia. Se registraron los pesos de las ratas y del alimento durante toda la gestación (**Esquema 8**).



Esquema 8: Modelo experimental de sobrepeso materno para la obtención de plasma y tejidos maternos, y plasma fetal, placentas y órganos fetales al día 21 de gestación, provenientes del grupo de ratas control (CT), del grupo de ratas control tratadas con butirato (CTB), del grupo de ratas de dieta grasa (DG) y del grupo de dieta grasa tratadas con butirato (DGB). El número 1 en el esquema indica el momento en el que se realizó la eutanasia.

Obtención de los tejidos maternos y fetales al día 21 de gestación.

Al día 21 de gestación, un día antes del día esperado para el parto, se realizó la eutanasia de los animales. Ese día se les evaluó la glucemia en ayunas utilizando tiras reactivas para medición de glucosa en sangre mediante un glucómetro FreeStyle (Abbott Laboratories). Los animales fueron anestesiados en una cabina de CO₂ y luego se les practicó la eutanasia por decapitación, y se colectó la sangre materna. Inmediatamente se realizó una incisión abdominal y se extrajo el útero para abrirlo y obtener los fetos. La sangre fetal también fue colectada por decapitación, tomando la glucemia de dos fetos al

azar. La sangre materna y fetal fue centrifugada en tubos con heparina para la separación del plasma, preservándose a -80°C . El plasma de todos los fetos se colectó en un tubo individual, una vez determinado el sexo de cada feto, se guardó plasma fetal de hembras y de machos por separado por cada madre. Bajo una lupa se determinó el sexo de cada feto y se removieron sus tejidos. Se registraron los pesos de las madres, fetos y tejidos. Para esta tesis se utilizaron los plasmas maternos, los hígados y el peso del tejido adiposo materno, el plasma, las placentas e hígados fetales de los 4 grupos. Además, se obtuvo el colon y contenido colónico materno, el tejido adiposo, el intestino y las gónadas tanto maternas como fetales, que fueron guardados para otros proyectos. Con los datos registrados, se realizó el índice hepático materno ($\text{peso del hígado} / \text{peso corporal} \times 100$) y el peso relativo del tejido adiposo materno ($\text{peso tejido adiposo abdominal} / \text{peso corporal} \times 100$). Los tejidos fueron conservados a -80°C para los distintos ensayos o fueron fijados con formaldehído al 4% para histología.

Entonces, para la primera parte de la tesis se utilizó el modelo experimental hasta el día 21 de gestación, teniendo 4 grupos experimentales: un grupo control con vehículo (CT, $n=8$), un grupo control con el tratamiento materno oral con butirato de sodio (CTB, $n=6$), un grupo de dieta grasa con vehículo (DG, $n=7$) y un grupo de dieta grasa con el tratamiento materno oral con butirato de sodio durante la gestación (DGB, $n=7$).

Diseño experimental modelo programación.

Por otro lado, para el modelo de programación, 15 ratas de 6 semanas de edad fueron separadas en 2 grupos: 5 ratas formaron parte del grupo CT y 10 ratas formaron parte del grupo DG, alimentadas con la dieta rica en grasas saturadas al igual que en el modelo gestacional. Como se explica en la sección de resultados, de acuerdo a la ausencia de efectos del butirato en las gestantes del grupo control, se decidió seguir sólo con tres grupos experimentales: CT, DG y DGB. Se mantuvo respectivas dietas durante 8 semanas, registrando los pesos de las ratas y del consumo de alimento. En este momento, cuando las ratas presentaban un sobrepeso adecuado, ambos grupos fueron apareados con machos CT de 10 semanas de edad. La observación de espermatozoides en el extendido vaginal determinó el día 1 de gestación. El 87% de las ratas quedaron preñadas dentro de los diez días de apareo. Las ratas que no fueron preñadas dentro de los 20 días fueron

excluidas del experimento. A un grupo de ratas preñadas del grupo DG se les administró oralmente vehículo (agua, tanto al **grupo CT como al DG**) o butirato de sodio 3% (g/100g de alimento, **grupo DGB**) diariamente durante toda la gestación. Los tratamientos dietarios continuaron a lo largo de la preñez. Se registraron los pesos de las ratas y del alimento durante toda la gestación. Se dejó nacer a la descendencia, ajustando la camada a 4 hembras y 4 machos al día 2 postnatal. Durante la lactancia se continuó alimentando a las madres con respectivas dietas. A partir del día 2 postparto, se continuó el tratamiento oral con butirato de sodio durante toda la lactancia al grupo DGB, 3 veces por semana en una concentración de 1% (g/100g de alimento). La reducción de dosis y frecuencia se debe a la disminución del peso post parto, que no guarda relación con la ingesta, a la protección del cuidado de las crías y a trabajos citados en bibliografía (Zhou et al., 2016). Los grupos CT y DG también recibieron el vehículo (agua) en la misma frecuencia y volumen. Se registraron los pesos de las crías durante la lactancia y la distancia ano-genital (**Esquema 9**).

Al día 21 post natal se realizó el destete. A partir de este momento la descendencia de todos los grupos experimentales comenzó a alimentarse con una dieta estándar.

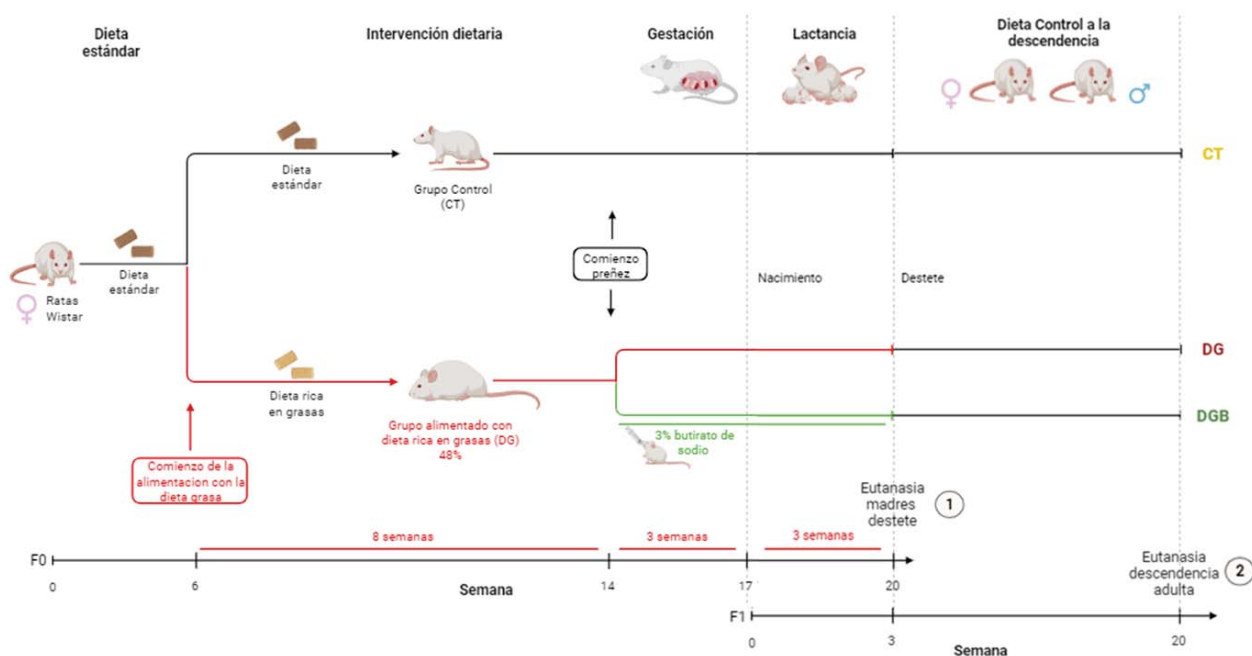
Obtención de los tejidos maternos al destete.

Luego del destete se les practicó la eutanasia a las madres, los animales fueron anestesiados en una cabina de CO₂ y luego se decapitaron, y se colectó la sangre materna para obtener el suero. Se realizó una incisión abdominal para obtener los tejidos maternos: el hígado, intestino, tejido adiposo y colon, tanto para esta tesis como para otros proyectos (**Esquema 9**). Se registró la glucemia, la longitud y el peso de las madres y de los tejidos, y se calculó el índice hepático y el peso relativo del tejido adiposo, al igual que en las madres al día 21 de gestación. Los tejidos fueron conservados a -80°C para los distintos ensayos o fueron fijados con formaldehído al 4% para histología.

Obtención de los tejidos de la descendencia a los 140 días de edad.

Luego del destete, la descendencia comenzó a alimentarse por sí misma con una dieta comercial estándar. Se registró el peso de la descendencia a lo largo del

experimento, hasta que llegaron a su adultez y se les practicó la eutanasia a los 140 días de edad (**Esquema 9**). A la descendencia hembra se les evaluó el ciclo estral durante 2 semanas previas a la eutanasia y se les practicó la eutanasia estando en metaestro o diestro. El día de la eutanasia se les evaluó la glucemia en ayunas utilizando tiras reactivas para medición de glucosa en sangre mediante un glucómetro FreeStyle (Abbott Laboratories). Los animales fueron anestesiados en una cabina de CO₂ y luego se les practicó la eutanasia por decapitación, y se colectó la sangre en tubos con heparina para la recolección de plasma. Al realizar la incisión abdominal, se obtuvieron los hígados, intestinos, colon, gónadas y tejido adiposo de la descendencia, registrando la longitud, contorno, los pesos corporales y de los tejidos para calcular el índice hepático y el peso relativo del tejido adiposo de la descendencia para esta tesis y otros proyectos. Los tejidos fueron conservados a -80°C para los distintos ensayos o fueron fijados con formaldehído al 4% para histología. Entonces, para la segunda parte de la tesis se utilizó el modelo de programación, teniendo 3 grupos experimentales: un grupo control con vehículo (CT, n=5), un grupo de dieta grasa con vehículo (DG, n=4) y un grupo de dieta grasa con el tratamiento materno oral con butirato de sodio durante la gestación y lactancia (DGB, n=4).



Esquema 9: Modelo experimental de sobrepeso materno para la obtención de suero y tejidos maternos al destete, y plasma y órganos de la descendencia a los 140 días de edad, provenientes del grupo de ratas control (CT), del grupo de ratas de dieta grasa (DG) y del grupo de dieta grasa tratadas con butirato (DGB). El número 1 en el esquema representa el momento en el que se realizó la eutanasia de las madres al destete y el número 2 representa el momento en el que se realizó la eutanasia de la descendencia a los 140 días de edad.

3.2 Parámetros reproductivos.

Con la ayuda de los miembros del Laboratorio de Endocrinología Reproductiva, con quienes compartí lugar de trabajo en los últimos años de mi tesis, evaluamos distintos parámetros reproductivos.

En la descendencia hembras se evaluó la duración del ciclo estral 2 semanas antes de la eutanasia (a partir de los 110 días de vida en adelante), tomando una muestra del extendido vaginal y evaluando en que estadio del ciclo estaba cada día, observándolo bajo microscopio óptico (Olympus CX21, Tokio, Japón) con un aumento 40 X. El ciclo estral en ratas consta de 4 estadios que se pueden diferenciar según las células presentes en el extendido: **proestro** con prevalencia de células epiteliales redondas y nucleadas, **estro** con prevalencia de células epiteliales queratinizadas escamosas sin núcleo, **metaestro**

con una mezcla homogénea de los 3 tipos celulares (leucocitos, células epiteliales nucleadas y queratinizadas), y **diestro** con prevalencia de leucocitos (Cora et al., 2015).

En la descendencia macho de 140 días de edad se registró la longitud y el peso de los testículos y de los epidídimos, y se calculó el índice testicular y epididimal mediante la relación entre el peso testicular o epididimal medio y el peso corporal, multiplicado por 100.

Por otro lado, se realizó el recuento espermático y la motilidad espermática. Para esto se recuperaron los espermatozoides de la cauda del epidídimo, utilizando 7 ml de PBS (0,05 M, pH 7,4) y precalentado a 37°C. Se procedió a realizar cortes en el epidídimo para permitir la liberación de los espermatozoides móviles por medio de la técnica “swim out”, y se incubaron a 37°C por 15 minutos. Así se obtuvo una suspensión homogénea de espermatozoides de cada animal para la realización del recuento y motilidad.

Recuento espermático: se realizó una dilución 1:3 de la suspensión de espermatozoides y se determinó la concentración de los mismos utilizando la cámara de Neubauer. Para ellos, se colocó 10 µl de la suspensión diluida en cada compartimiento de la cámara y se observó bajo microscopio con un aumento de 40X para contar el número de espermatozoides. Se corrigió el valor por el factor de dilución y se expresaron los resultados como millones de células/ml.

Recuento espermático = media de los recuentos de los dos compartimientos x factor de dilución

$$\text{Factor de dilución} = \left(\frac{\text{volumen inicial}}{\text{volumen transferido para la dilución}} \right) \times \left(\frac{\text{volumen final}}{4 \times 10^{-6} \times n^{\text{cuadrados}}} \right)$$

Motilidad espermática: se determinó visualmente bajo microscopio óptico, con aumento 40 X, y utilizando una platina térmica a 37 °C para la mantención con vida de las células. Para ello se utilizó una alícuota de la suspensión original de espermatozoides y se analizaron 200 espermatozoides por duplicado por ejemplar que se clasificaron en:

A: Espermatozoides móviles

B: Espermatozoides inmóviles

Los resultados se expresaron como la media del porcentaje de motilidad espermática: **A** x 100/200 ± SEM.

3.3 Análisis bioquímicos en suero materno y plasma fetal y de la descendencia de 140 días de edad.

Se utilizaron kits comerciales (Wiener lab., Rosario, Argentina) para evaluar en plasma de madres al día 21 de gestación, de fetos, de la descendencia de 140 días de edad y en suero de madres al destete los niveles de triglicéridos, colesterol, bilirrubina total, albúmina (únicamente en el caso de suero), y las actividades de la fosfatasa alcalina (ALP) y ambas enzimas hepáticas, alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST). Para todos, se siguió el protocolo sugerido por el fabricante, con algunas modificaciones, que a continuación se detallan. Estos análisis se realizaron en todos los grupos de los distintos modelos experimentales. En el caso de la actividad ALP, AST y ALT, en algunos grupos no se pudo realizar ya que los plasma perdieron la actividad al momento que pudimos medirla, ya que había pasado bastante tiempo.

Trigliceridemia: Se utilizó el kit TG Color (Cod. #1780107) que se basa en un método enzimático para la determinación de triglicéridos en suero o plasma. Para el mismo, utilizamos 5 µl de muestra (plasma o suero) o 5 µl de estándar y le agregamos 200 µl del reactivo provisto. Se incubó 5 minutos a 37°C y se leyó en espectrofotómetro a 505 nm. Los resultados se expresan como concentración de triglicéridos en g/l.

Colesterolemia: Se utilizó el kit Colestat enzimático AA línea líquida (Cod. #1220114) que se basa en un método enzimático para la determinación de colesterol en suero o plasma. Para el mismo, utilizamos 5 µl de muestra (plasma o suero) o 5 µl de estándar y le agregamos 200 µl del reactivo provisto. Se incubó 5 minutos a 37°C y se leyó en espectrofotómetro a 505 nm. Los resultados se expresan como concentración de colesterol en g/l.

Bilirrubina total: La bilirrubina, compuesto de degradación de la hemoglobina, es captada por el hígado para su conjugación y excreción en la bilis. Las alteraciones hepatocelulares u obstrucciones biliares pueden provocar hiperbilirrubinemias. Utilizamos el kit Bilirrubina total AA (Cod. #1120005) que utiliza un método DPD para la determinación de bilirrubina total en suero o plasma. Para esto, utilizamos 5 µl de muestra con 160 µl del reactivo B provisto y 40 µl del reactivo de trabajo provisto. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y luego se mide en el espectrofotómetro a 546 nm. Se utiliza el calibrador A plus y realiza tanto el blanco de la muestra como el blanco del calibrador,

necesario para calcular la concentración. Los resultados se expresan como mg/l de bilirrubina total.

Albumina: La hipoalbuminemia ocurre en condiciones patológicas tales como pérdida excesiva de proteínas en el síndrome nefrótico, desnutrición, infecciones prolongadas, quemaduras severas. Otras causas son disminución en la síntesis por una dieta deficiente, enfermedad hepática o malabsorción. Utilizamos el kit Albumina AA (Cod. #1690008) que utiliza un método colorimétrico para la determinación de albúmina en suero. Para el mismo, utilizamos 5 µl de muestra y le agregamos 200 µl del reactivo provisto. Luego de 10 minutos se lee en un espectrofotómetro a 625 nm. Los resultados se expresan como g/dl, utilizando un calibrador A plus para obtener la concentración de albumina.

Actividad fosfatasa alcalina: La fosfatasa alcalina es una enzima ampliamente distribuida en el organismo. Hidroliza los monoésteres del ácido ortofosfórico en medio alcalino. Fisiológicamente hay un aumento que se produce al final del primer trimestre del embarazo, a expensas de la isoenzima placentaria que en éste período alcanza niveles máximos. Utilizamos el kit ALP 405 AA línea líquida (Cod. #1009809) que utiliza un método cinético optimizado (DGKC y SSCC) a 405 nm, para la determinación de fosfatasa alcalina. Para el mismo, utilizamos 5 µl de muestra con 200 µl del reactivo provisto llevado previamente a 37°C. Luego de 20 segundos, comentamos a leer en el espectrofotómetro a 405 nm 10 veces cada 1 minuto. Los resultados se expresan de la siguiente forma: Fosfatasa alcalina (U/l) a 405 nm = $\Delta A/\text{min} \times 5.460$

Actividad alanina aminotransferasa: La alanina aminotransferasa (ALT o GPT) es una enzima unilocular (citoplasmática) cuya mayor actividad se localiza en el tejido hepático. La destrucción o cambio de permeabilidad de las membranas celulares provoca la liberación de ALT a la circulación sanguínea. Los mayores aumentos de actividad ALT en suero, se producen como consecuencia de alteraciones hepáticas. Utilizamos el kit GPT (ALT) AA (Cod. #1761351) que utiliza un método UV optimizado (IFCC) para la determinación de alanina aminotransferasa (GPT/ALT) en suero o plasma. Para esto, se tomaron 5 µl de la muestra y se le agregó 200 µl del reactivo provisto llevado previamente a 37°C. Luego de 1 minuto se comenzó a medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 340 nm 10 veces cada 1 minuto. Los resultados se expresan de la siguiente forma: GPT (U/l) = $\Delta A/\text{min} \times \text{factor}$

Actividad aspartato aminotransferasa: La aspartato aminotransferasa es una enzima bilocular (citoplasmática y mitocondrial) ampliamente difundida. Se encuentra en mayor concentración en hígado y corazón. Cualquier alteración de estos tejidos produce un aumento en los niveles de AST circulante. Utilizamos el kit GOT (AST) AA (Cod. #1751351) que utiliza un método UV optimizado (IFCC) para la determinación de aspartato aminotransferasa (GOT/AST) en suero o plasma. Para esto, se tomaron 5 µl de la muestra y se le agregó 200 µl del reactivo provisto llevado previamente a 37°C. Luego de 1 minuto se comenzó a medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 340 nm cada 1 minuto 10 veces. Los resultados se expresan de la siguiente forma: GOT (U/l) = $\Delta A/\text{min} \times \text{factor}$

Niveles de IL-1 β circulante: Utilizamos el kit para desarrollo del ELISA sándwich para IL-1 β de rata (Cod. LS-F31392, LSBio). Medimos cuantitativamente los niveles circulantes de IL-1 β en el plasma de las ratas gestantes al día 21 de gestación y en el suero de las ratas gestantes al destete provenientes del grupo CT, DG y DGB, siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Para eso, se prepararon las placas con el anticuerpo de captura y se agregaron 100 µl de las muestras y los estándares a la placa por 2 horas a temperatura ambiente. Al quitar el sobrenadante y luego de 4 lavados, se agregó 100 µl del anticuerpo de detección por 2 horas a temperatura ambiente. Luego de aspirar cada pocillo y lavar 4 veces, se agregó 100 µl del conjugado avidina-HRP a cada pocillo por 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, luego de aspirar cada pocillo y lavar 4 veces, se agregó 100 µl de la solución de sustrato ABTS para el desarrollo del color. Se monitoreó el desarrollo del color con un lector de placas cada 5 minutos por 50 minutos a 405nm con corrección de longitud de onda ajustada 650nm. Los resultados se expresan como pg/ml.

3.4 Determinación de proteínas.

Para distintas técnicas que serán explicadas más adelante se utiliza la concentración de proteínas de las muestras para normalizar las mediciones. La determinación de proteínas de las muestras fue realizada según la técnica descrita por Bradford (Bradford, 1976). En primer lugar, se realizó una prueba de la dilución de las

muestras para definir la que entra en la curva de calibración, utilizando una mezcla de algunas muestras. Se tomó una alícuota del tejido homogeneizado correspondiente según la técnica y se realizó una dilución en solución salina dependiente del tejido (de 1:20 para tejido hepático y 1:15 para placentas). Se tomaron 5 µl de la dilución y se mezclaron con 500 µl de solución de reactivo de Bradford (en una concentración 1:5 en solución salina, Bio-Rad). La concentración proteica de la muestra se calculó mediante la comparación de la absorbancia obtenida con una curva de calibración realizada utilizando seroalbúmina bovina (BSA) en diferentes cantidades, como curva estándar. En tubos de vidrio se preparó la curva colocando las distintas cantidades de BSA (0 µg, 2 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg, 10 µg, 12 µg, 14 µg, 16 µg, 18 µg, 20 µg) y se le agregó 1000 µl de reactivo de Bradford. Se colocó 200 µl de cada tubo de reacción (con muestra y con de todos los puntos de la curva) en una placa de 96 wells. Cada muestra fue sembrada por duplicado para minimizar errores. Luego de 5 minutos se determinó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595nm.

3.5 Determinación del contenido lipídico en placentas e hígados mediante cromatografía en capa delgada (TLC).

Extracción lipídica.

Con el fin de analizar los niveles lipídicos en el tejido hepático y placentario, se realizó la extracción de lípidos por el método Bligh-Dyer (Bligh and Dyer, 1959). Para esto se utilizó explantos de hígado materno al día 21 de gestación y al destete, hígado fetal, hígado de la descendencia a los 140 días de edad y placentas al día 21 de gestación, de todos los grupos en estudio. De cada muestra se tomaron 100 mg de tejido y se homogeneizaron en 1 ml de PBS (K_2HPO_4 1.5 g/l, KH_2PO_4 0.2g/l, NaCl 7.75 g/l). Se separó una alícuota para calcular la concentración de proteínas para luego normalizar los resultados (método de Bradford, sección 3.4). Se tomaron 500 µl del homogenato y se realizaron dos rondas de extracción orgánica con 3,5 ml de la solución Bligh-Dyer (Cloroformo:Metanol 1:2). Al volumen de la extracción se le agregó 1 ml de cloroformo

y 1 ml de agua. Luego de la centrifugación se formaron dos fases: una superior acuosa (MeOH:H₂O) y una inferior clorofórmica (CHCl₃). Se descartó la fase superior y se evaporó al vacío la fase orgánica. Se reconstituyó el residuo con 1 ml de solución Bligh-Dyer. Se conservó a -20 °C para su posterior análisis.

Cromatografía en capa delgada (TLC).

Se tomó una alícuota de 200 µl de cada extracto de lípidos y se evaporó a vacío. Cada una fue reconstituida en 25 µl de solución Bligh-Dyer y sembrada con un capilar en placas de TLC Sílica gel 60 (Merck), lavadas previamente con metanol. De la misma manera, junto con las muestras, se sembró una curva estándar de cantidades conocidas de las distintas especies lipídicas a analizar. Cada placa se desarrolló con una solución hexano: éter: ácido acético 80:20:2 para el desarrollo de lípidos neutros, se dejó secar y se reveló con vapores de yodo para observar los niveles de las distintas especies lipídicas. El yodo se combina con las moléculas hidrofóbicas, evidenciando la presencia de los lípidos por la aparición de manchas marrones. En la placa se puede observar la movilidad de los lípidos según la polaridad, a menor polaridad, mayor movilidad (**Fig. 1**). Luego, las placas fueron digitalizadas y analizadas por densitometría con el programa Image J. Los valores obtenidos representan una relación de la intensidad y el área de las manchas. Estos valores se refirieron a la curva estándar de cada especie lipídica y los resultados se expresaron como µg de lípido/mg de proteína. Las especies lipídicas analizadas fueron fosfolípidos, colesterol, ácidos grasos libres, triglicéridos y ésteres de colesterol (**Fig. 1**).

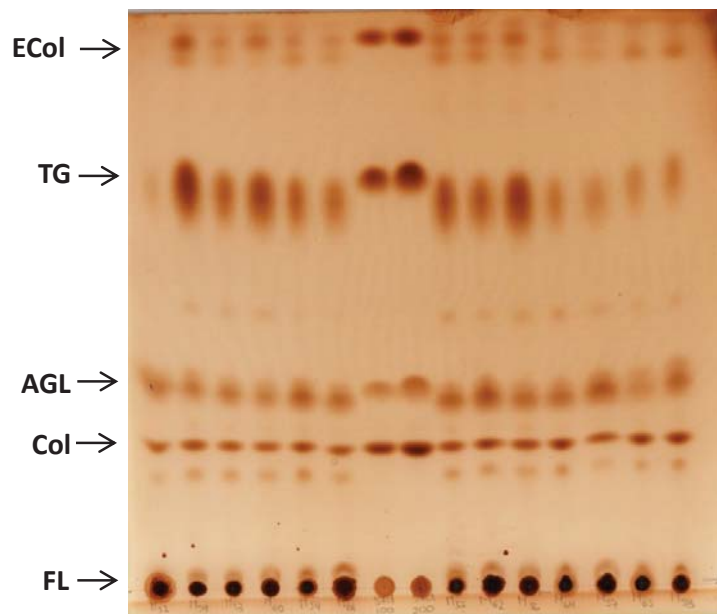


Figura 1: Placa de sílica para TLC sembradas con muestras y estándares, observándose la movilidad de las distintas especies lipídicas según la polaridad.

3.6 Determinación de niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo de lípidos.

Extracción de ARN.

Para la extracción del ARN mensajero se utilizó el reactivo RNAzol® RT (Molecular Research Center), según las recomendaciones del fabricante. Para esto, 100 mg del tejido se homogeneizaron (explantos de hígado materno al día 21 de gestación y al destete, hígado fetal, hígado de la descendencia a los 140 días de edad y placentas al día 21 de gestación) en 1 ml de RNAzol® RT. El homogenato fue separado en fase acuosa y orgánica por adición de 0,4 ml de H₂O y posterior centrifugación, precipitando el ADN y las proteínas. El ARN permanece exclusivamente en el sobrenadante, por lo tanto, la fase orgánica fue descartada. Luego se precipitó el ARN por el agregado de 0,4 ml de etanol 75%, dejándolo a temperatura ambiente por 10 minutos y centrifugándolo. Se realizaron dos lavados con etanol 75% y finalmente se solubilizó en agua estéril libre de ARNasas. Se guardó a -80°C para su posterior análisis.

La concentración de ARN presente en cada muestra fue cuantificada mediante un espectrofotómetro NANODROP 1000 (Thermo Scientific), midiendo la absorbancia a 260 nm. La pureza y la presencia de contaminantes de los extractos de ARN se determinó midiendo las relaciones de absorbancias 260/280 y 260/230 nm, utilizando únicamente las muestras que posean ambas relaciones de $2\pm 0,1$.

Síntesis de ADN complementario.

A partir del ARN se sintetizó el ADN complementario (cDNA) por transcripción reversa. Para esto se tomaron 4µg del ARN extraído y se colocó en una primera mezcla de reacción que contiene cebadores hexámeros al azar (Random Primers, Promega). Se colocó en un termociclador durante 5 minutos a 70°C para desarmar estructuras secundarias y permitir el acceso de los cebadores a las cadenas de ARN mensajero. Luego se le adiciona una segunda mezcla de reacción que contiene la enzima M-MLV (transcriptasa reversa, Promega), los dNTPs (Invitrogen) y el buffer comercial correspondiente a la enzima (Promega). En esta segunda etapa, se utilizó una temperatura de 37 °C durante 60 minutos para sintetizar el cDNA, seguida de 70°C por 15 minutos para inactivar la MMLV y linealizar el cDNA. El cDNA fue congelado a -20°C para su posterior análisis.

Amplificación.

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) de los genes involucrados en el metabolismo de lípidos y en la respuesta inflamatoria. Para esto, se utilizó como ADN molde el cDNA sintetizado anteriormente de todos los grupos en estudio. Una dilución del cDNA fue amplificada por PCR en tiempo real en una mezcla de reacción que contiene dNTPs (Biocientífica), enzima GoTaq Polimerasa (Promega), el intercalante fluorescente Eva Green 20X (Biotium) y el par de cebadores específico (ThermoFisher). El seguimiento en tiempo real de la cuantificación por fluorescencia de los productos de amplificación se realizó en un CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad).

Las secuencias de cebadores específicos para los genes de interés fueron diseñadas con el Primer Blast, seguido de comprobar su eficiencia con OligoCalc. Para el diseño de los mismos, se seleccionó con preferencia el par de tal manera que se amplificara una región del ARNm que abarque al menos una secuencia intrónica para no amplificar posibles contaminaciones con ADN genómico, que el tamaño del producto sea menos a 200 pb, que posea idealmente 60% G+C, que en el extremo 3' posea una G o una C, entre otros criterios. En la **Tabla 3** se muestran las secuencias utilizadas, junto con la temperatura de melting óptima para cada uno, calculadas con la fórmula (1) por cebador.

$$Tm = 4 \times (G + C) + 2 \times (T + A) \quad (1)$$

Gen/Cebador	Sentido (5'-3')	Anti-sentido (5'-3')	Tm
<i>Acaa2</i>	GCCGCCACACTATTAAGGCT	CGCTTCGCAGCAACGATAAA	60°C
<i>Acc1</i>	CCAGACCCTTTCTTCAGCAG	AGGACCGATGTGATGTTGCT	60 °C
<i>Aco</i>	CCAATCACGCAATAGTTCTGG	CGCTGTATCGTATGGCGAT	60°C
<i>Ahr</i>	GTCCATGTACCAGTGCCAGG	GCTCAAGTCTGCCGAGTAGG	64°C
<i>B2μG</i>	CCGTGATCTTTCTGGTGCTT	ATTTGAGGTGGGTGGAAGT	60°C
<i>Cd36</i>	CGAAGGCTTGAATCCTAACGAA	CCGATGGTCCCAGTCTCATT	64°C
<i>Cpt-1</i>	AGGTCTGGCTCTACCACGAT	CGTGCAAAATAGGTCTGCCG	62°C
<i>Cyp4a1</i>	CGACACAGCCACTCATTCTT	AGCACAAGTCGTGGTAAGGG	62°C
<i>Fasn</i>	TCGAGACACATCGTTTGAGC	CCCAGAGGGTGGTTGTTAGA	60°C
<i>Fabp5</i>	ATTGTTTCATGACGCACTCCA	CTTGACCTTGGGAGAGAAG	60 °C
<i>Fatp-1</i>	CGCTTTCTGCGTATCGTCTG	AAGATGCGTGGGATCGTGTC	62°C
<i>Hadha</i>	ATTGGCAGTCTCAGTCGCTT	AGAAGTTGTAAAGCTGTGGCA	60°C
<i>Il-18</i>	CCTGCATCACACAGAGACCTT	TGGAGCAGGCAGCTAGGATT	64°C
<i>L32</i>	TGGTCCACAATGTCAAGG	CAAAACAGGCACACAAGC	54°C
<i>Lip g</i>	TCTATTGTTGCTTCCCGGCG	CGGTGGGTTTATGGTGCTCA	62°C
<i>Lpl</i>	CCCTAAGGACCCCTGAAGAC	GGCCCGATACAACCAGTCTA	62°C

<i>Lxra</i>	AGTGTAACAGGCGCCTCCTTC	CCAGCTCAGTAAAGTGGGCA	62 °C
<i>Nlrp3</i>	CGTGTTGTCAGGATCTCGCA	AGCACAGTGAAGTAAGGCCG	60°C
<i>Plin2</i>	CAAAAGGGCCAGGAGACCAT	GTATGTGACTCGATGTGCTCAG	64°C
<i>Pparg</i>	CCCTGGCAAAGCATTGTAT	ACTGGCACCTTGAAAAATG	58 °C
<i>s18</i>	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GGGCCTCGAAAGAGTCCTGT	62°C
<i>Sod2</i>	ACTCAGGTTGCTCTTCAGCC	CCTTGGACTCCCACAGACAC	64°C
<i>Srebp-1c</i>	TAACCTGGCTGAGTGTGCAG	ATCCACGAAGAAACGGTGAC	62°C

Tabla 3: Secuencias de cebadores utilizados para RT-qPCR, T_m: temperatura de melting óptima por gen.

La dilución de cDNA utilizada fue seleccionada mediante la realización de una curva de concentración de cDNA, que consistió en la amplificación de diluciones en serie del cDNA de interés. Se corroboró que la eficiencia de amplificación de la curva fuera de $1 \pm 0,2$ y se seleccionó un valor de dilución que se encuentre dentro del rango de eficiencia de todos los genes en estudio, dentro del rango lineal de amplificación. La concentración de cebadores y la temperatura de apareamiento y extensión se seleccionaron de manera que no se observara dímeros de cebadores y que las curvas tengan un comportamiento exponencial llegando a una meseta. En la **Tabla 4** se observa el programa utilizado para todas las amplificaciones, variando únicamente la temperatura de melting específica para cada gen, presentadas en la tabla anterior.

Programa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Holding	95	5 minutos	1
Cycling	95	10 segundos	40
	T _m	15 segundos	
	72	20 segundos	

Tabla 4: Programa de amplificación utilizado para los ensayos de RT-qPCR.

La detección directa de los productos de PCR se monitoreó midiendo el incremento en la fluorescencia resultante de la unión del colorante al ADN doble cadena. Todas las muestras fueron testeadas contra tres genes de referencia, la proteína ribosomal L32, la cadena liviana del complejo mayor de histocompatibilidad β 2-microglobulina ($B2\mu G$), y el ARN ribosomal 18s. Los genes de referencia fueron usados como controles internos para la normalización de datos, procedimiento necesario para la corrección de las variaciones entre muestras en calidad y cantidad de cDNA. Se utilizó como control negativo la amplificación de la mezcla de reacción sin cDNA.

El análisis de los resultados se procesó en el programa Bio-Rad CFX Maestro. La cuantificación de los niveles de ARN mensajero de los genes blanco fue realizada mediante un análisis por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. El método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ se utiliza para calcular los cambios relativos en la expresión génica determinada a partir de experimentos de RT-qPCR. De esta manera, se evaluaron los resultados como cantidad de copias de ARN mensajero del gen de interés con respecto al grupo control (ambos relativizados a la media geométrica de los genes de referencia) (Livak and Schmittgen, 2001). El C_t (del inglés *cycle threshold*, cuya traducción es ciclo umbral) representa la intersección del valor del eje x (número de ciclos) con el umbral estipulado automáticamente por el programa, de las curvas de amplificación que brinda el programa. Al utilizar tres genes de referencia, se calculó la media geométrica para las comparaciones del gen de interés y los genes de referencia. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia.

3.7 Determinación de niveles proteicos mediante Western blot.

Se homogeneizó 100 mg de tejido (explantos de placentas al día 21 de gestación de los grupos CT, DG y DGB) en 1 ml de buffer D (250 mM de sucrosa en 10 mM de buffer Hepes-Tris, agregando inhibidor de proteasas (1:100)), siempre en hielo. Se fraccionó el homogenato para su conservación a -80°C , separando una alícuota para la medición de la concentración de proteínas por el método de Bradford (Sección 3.4). Para la evaluación de los niveles de proteínas mediante la técnica de Western blot (Federici et al., 2001) se tomó de cada muestra una alícuota de volumen equivalente a 70 μg de

proteínas, y se diluyó en buffer muestra 4X (Trizma base 10 mM, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.06%, β -mercaptoetanol 5%). Antes de la siembra, las muestras se llevaron a un baño térmico de 99°C durante 5 minutos con el objetivo de desnaturalizar las proteínas.

Se sembraron las muestras en un gel de poliacrilamida al 12% para separar las proteínas por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) en condiciones desnaturalizantes. La electroforesis se realizó en amperaje constante, 20 minutos a 40V, 30 minutos a 100V y 45 minutos a 150V. En una de las calles se sembró el marcador de peso molecular Rainbow (GE Healthcare). Al finalizar la electroforesis, los geles fueron lavados en buffer de transferencia (Trizma base 20 mM, glicina 150 mM, metanol 20%, pH 8.8), con el objeto de eliminar el SDS remanente. Se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μ m (Trans-Blot Turbo Mini Nitrocellulose Transfer Membrane, BioRad).

Para corroborar la eficiencia de la carga y de la transferencia, las membranas fueron coloreadas con Rojo Ponceau. Luego las membranas fueron bloqueadas durante 60 minutos con solución de bloqueo (1% de BSA en TBS: Trizma base 25 mM, NaCl 136.7 mM, KCl 2.68 mM, pH 7.4) y posteriormente incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 5**) durante 24 horas en cámara fría a 4°C y en agitación. Tras realizar tres lavados con TBS-Tween para eliminar el anticuerpo que no se unió específicamente, se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 5**). Nuevamente se realizaron los lavados y se procedió a detectar la señal de quimioluminiscencia al agregar el kit comercial Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). Las membranas fueron reveladas en un equipo diseñado para la adquisición de imágenes de quimioluminiscencia, GeneGnome XRQ (Syngene). Se realizó un control negativo incubando una calle únicamente con el anticuerpo secundario, omitiendo el anticuerpo primario.

Mediante este ensayo se midió la expresión de proteínas involucradas en el transporte de lípidos (FABP4), en la incorporación dentro de la célula de lípidos (CD36), y en la formación de gotas lipídicas (PLIN2). A continuación, en la **Tabla 5** se muestran los anticuerpos primarios y secundarios de las proteínas de interés.

Anticuerpo primario (peso molecular)	Dilución	Tipo/Especie en donde se desarrollo	Anticuerpo secundario	Dilución
Anti-CD36 (88 KDa) (Santa Cruz)	1:100	Monoclonal/ratón	Contra ratón (Jackson)	1:10000
Anti-FABP4 (15 KDa) (GeneTex)	1:500	Policlonal/conejo	Contra conejo (Jackson)	1:5000
Anti-Plin2 (48 KDa) (LifeSpan BioSciences)	1:250	Monoclonal/ratón	Contra ratón (Jackson)	1:10000
Anti-Actina (42 KDa) (Sigma)	1:500	Policlonal/conejo	Contra conejo (Jackson)	1:5000

Tabla 5: Anticuerpos utilizados para los ensayos de Western Blot.

En los casos en los que la misma membrana se utilizó para determinar dos proteínas diferentes, como es el caso de la actina, la membrana fue sometida a remoción del anticuerpo primario mediante un “Harsh Stripping”. El buffer se prepara con 20 ml de dodecilsulfato sódico 10% (SDS 10%), 12.5 ml de Tris HCl pH 6.8 0.5M, 67.5 ml de agua bidestilada y 0.8 ml de β -mercaptoetanol. Se incubaron con el buffer por 1 hora a 50°C y luego lavar tres veces durante 10 minutos con TBS-Tween a temperatura ambiente. Luego de este proceso la membrana fue incubada con solución de bloqueo durante 60 minutos y con el anticuerpo primario de la segunda proteína a detectar.

La intensidad de las bandas fue analizada empleando el programa Image J, teniendo en cuenta tanto la superficie como a la intensidad de las mismas, expresándose en unidades densitométricas arbitrarias relativas al control, luego de normalizarlo según el valor densitométrico correspondiente a la actina.

3.8 Lipoperoxidación, ensayo TBARS.

Los niveles de peroxidación lipídica se evaluaron mediante un ensayo de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). La principal sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (TBA), el malondialdehído (MDA), es un dialdehído de tres carbonos altamente reactivo, generado como uno de los principales bioproductos de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados y también durante el metabolismo del ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas (Janero, 1990; Marnett, 1999). En este ensayo, se cuantifica el MDA. Para esto, 120 mg de tejido (explantos de hígados maternos al día 21 de gestación, al destete y de hígados de la descendencia de 140 días de edad, de los grupos CT, DG y DGB) se homogenizaron con 1 ml de buffer TRIS-HCL 0.1M pH7.4. Se separó una alícuota para la medición de proteínas por el método de Bradford (sección 3.4) y se centrifugó el homogenato restante a 15.000 rpm por 20 minutos. A 500 μ l de sobrenadantes se le agregó 500 μ l de ácido tricloroacético 40% (TCA) y se agitó para precipitar las proteínas. Se centrifugó 15 minutos a 3.000 rpm y se transfirió 900 μ l de sobrenadante a otro tubo y se le agregó 500 μ l de TBA. Luego de agitar, se llevó a ebullición en un baño térmico a 100°C durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se frena la reacción enfriándolo con hielo. Se colocó 200 μ l en una placa de 96 wells y se leyó la absorbancia a 540 nm. El mismo procedimiento se realizó con concentraciones seriadas de MDA desde 0,625 nmoles/ml a 10 nmoles/ml, para realizar la curva estándar de MDA, y también con agua como blanco. Los resultados se expresaron como nmol de TBARS/mg de proteínas.

3.9 Análisis estadístico.

Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar medio (SEM). Se utilizó el software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Inc) para los análisis estadísticos. Para la elección de una prueba paramétrica o no paramétrica se corroboraron los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas mediante el test de Shapiro-Wilk y el test de Levene. En caso de comprobar los supuestos, se compararon los grupos realizando las pruebas paramétricas ANOVA de un factor o ANOVA de dos factores y los post-test

Tukey, Bonferroni o Holm-Sidak, dependiendo si se compararon 3 grupo o 4 grupos. En el caso de no pasar los supuestos, se realizaron pruebas no paramétricas. Además, se realizó el análisis de correlación para evaluar si había relación entre dos variables, y las que fueron significativas se evaluó su relevancia biológica y se agregó a los resultados. En todos los casos, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el p-valor $< 0,05$. Únicamente se descartaron los datos que el programa considera outliers,

4. RESULTADOS

Los resultados de la presente tesis se presentarán en dos partes: la parte A para el **modelo gestacional**, siguiendo la preñez hasta el día 21 de gestación; y la parte B para el **modelo de programación**, para lo que dejamos nacer a las crías hasta su adultez a los 140 días de edad.

De manera previa, observamos alteraciones en la gestante, los fetos y las placentas de rata con sobrepeso. Durante los estudios en el **modelo gestacional**, se profundizó el estudio de dichas alteraciones y se analizó si el tratamiento con butirato era capaz de atenuar las alteraciones vistas previamente en la descendencia de madre con sobrepeso. Como se mencionó en la Introducción, la obesidad y dietas ricas en grasas saturadas disminuyen el contenido colónico de butirato, por lo que no se esperaban efectos no deseados en las ratas con sobrepeso. De todas formas, administramos butirato a ratas controles, para evaluar potenciales efectos deseados o no deseados en las progenitoras, las placentas y los fetos. Por lo tanto, en este modelo tenemos 4 grupos experimentales: grupo de ratas control (**CT**), grupo de ratas control tratadas con butirato (**CTB**), grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (**DG**) y grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas tratadas con butirato (**DGB**).

Dado que el butirato mostró no inducir teratogenicidad ni cambios de peso u otros cambios de relevancia en las ratas al día 21 ni en los fetos de ratas control, decidimos, para el **modelo de programación**, realizar una camada de animales con 3 grupos experimentales: grupo de ratas control (**CT**), grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (**DG**) y grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas tratadas con butirato (**DGB**).

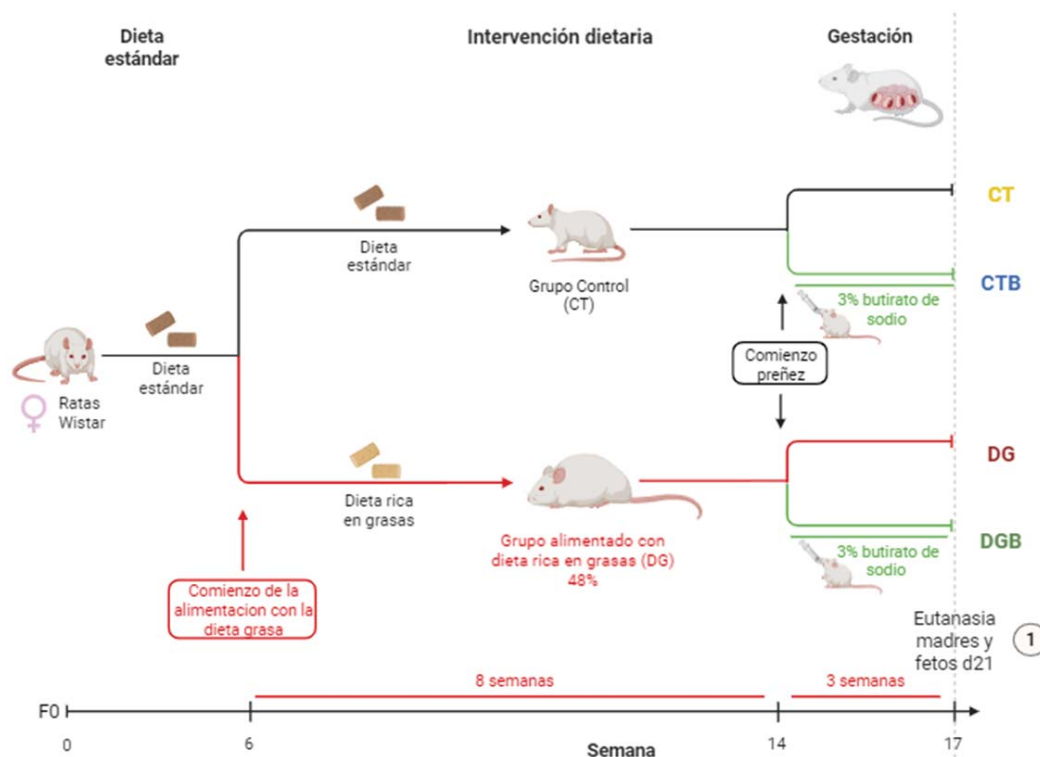
PARTE A: Modelo gestacional

CAPÍTULO 1: Efecto del sobrepeso materno por una dieta rica en grasas saturadas. Caracterización del modelo dietario y tratamiento con butirato durante la gestación.

Para este trabajo desarrollamos y establecimos un modelo de sobrepeso materno para el estudio de la descendencia a nivel metabólico y el potencial efecto protector del butirato. En trabajos previos observamos que la descendencia de rata con sobrepeso presenta alteraciones metabólicas, hepáticas e intestinales compatibles con la EHGNA, incluido el incremento en la permeabilidad intestinal (Heinecke et al., 2024, 2020).

El butirato es, al igual que otros ácidos grasos de cadena corta (AGCC), un producto de la fermentación de la fibra dietaria por la microbiota intestinal (McNabney and Henagan, 2017; Parada Venegas et al., 2019). Dado que pacientes con obesidad desarrollan disbiosis y que poseen menores concentraciones de bacterias productoras de AGCC, y por lo tanto menores concentraciones de AGCC (Parada Venegas et al., 2019; Banasiewicz et al., 2020; Ziętek et al., 2021; Serena Coppola et al., 2021), decidimos administrarles directamente un AGCC, butirato, durante la gestación para evaluar si podíamos atenuar las alteraciones de la descendencia con una intervención desde la vida intrauterina y en sus etapas tempranas del desarrollo.

Tal como se detalla en metodología (sección 3 de la presente tesis), ratas hembra de la cepa albino Wistar se alimentaron con dietas diferenciales a partir de la semana seis de vida y hasta el día 21 de gestación, momento en el cual se le practicó la eutanasia a las ratas de todos los grupos. El **grupo CT** se conformó de la siguiente manera: ratas de 21 días de gestación alimentadas con dieta estándar y sus fetos. El **grupo DG** se conformó de la siguiente manera: ratas de 21 días de gestación alimentadas con dieta rica en grasas saturadas y sus fetos (**Esquema 10**).



Esquema 10: Modelo experimental de sobrepeso materno para la obtención de plasma y tejidos maternos, y plasma fetal, placentas y órganos fetales al día 21 de gestación, provenientes del grupo de ratas control (CT), del grupo de ratas control tratadas con butirato (CTB), del grupo de ratas alimentada con dieta rica en grasas (DG) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas tratadas con butirato (DGB). El número 1 en el esquema indica el momento en el que se practicó la eutanasia.

Peso materno previo a la gestación.

Se registró el peso corporal de las ratas CT y DG a partir del inicio del tratamiento dietario (semana 6 de vida) para estudiar la dinámica de crecimiento de manera previa a la preñez. En la semana 11 de vida, luego de 5 semanas de tratamiento dietario, las ratas del grupo DG presentaron un mayor peso corporal respecto del grupo CT (CT vs DG, $p < 0,05$) (**Fig. 2**). Este aumento continuó hasta la semana 14 de vida, momento en el cual habían pasado 8 semanas de dieta, y cuando las ratas del grupo DG presentaron un incremento del 13% en su peso corporal (CT vs DG, $p < 0,05$) (**Fig. 2**).

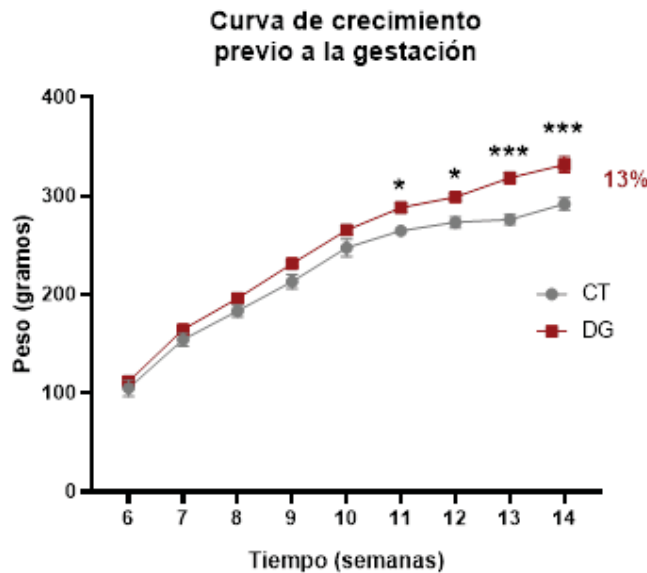


Figura 2. Peso materno previo a la gestación. Curvas de crecimiento provenientes del grupo de ratas control (CT, n=14) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=14) a partir de la semana 6 hasta la semana 14 de vida, previo a la gestación. Diferencias significativas: *p-valor<0,05 ***p-valor<0,001 vs. CT. Test estadístico: Anova de dos factores, post-test Bonferroni.

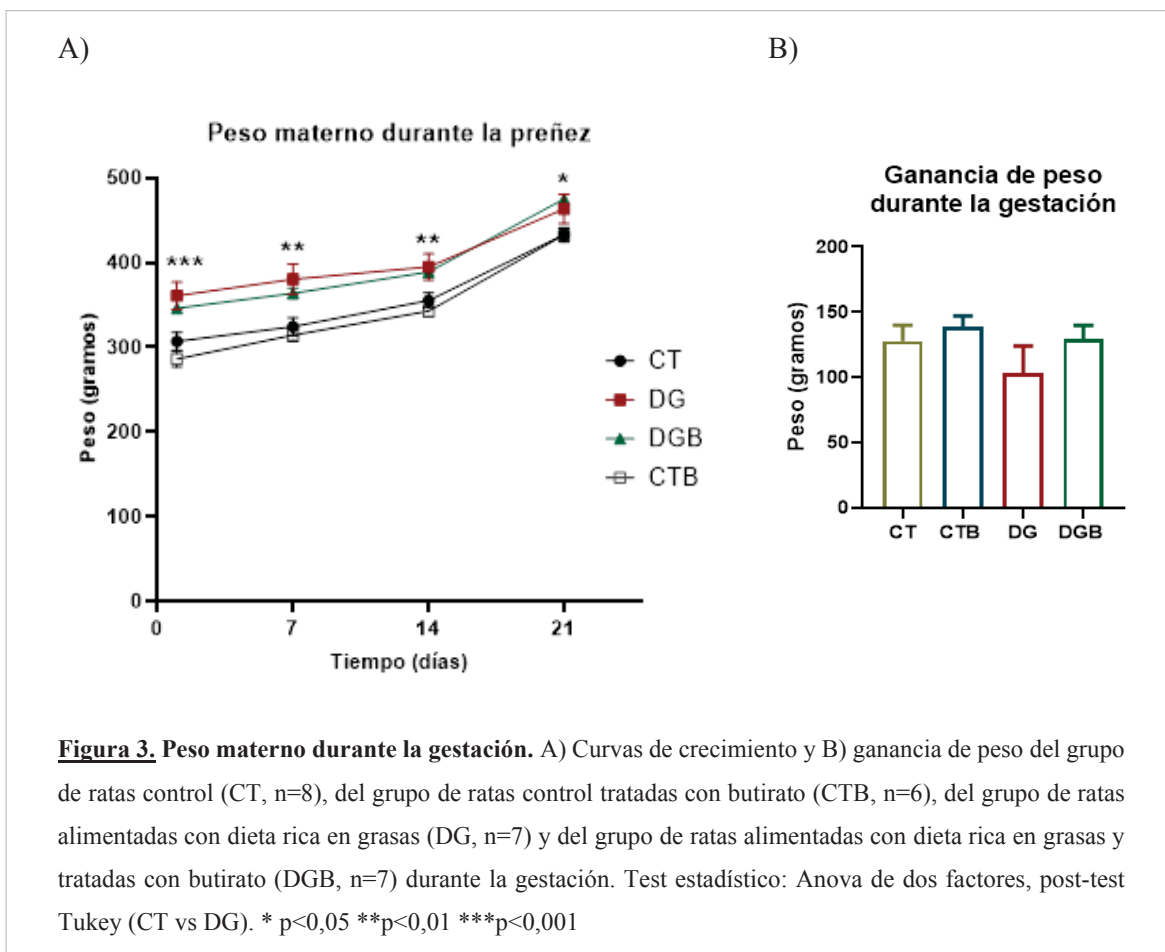
Tratamiento con butirato durante la gestación.

Al registrar el día 1 de gestación, 6 ratas del grupo CT y 7 ratas del grupo DG, recibieron un tratamiento oral de 3% de butirato de manera diaria durante toda la gestación (**CTB** y **DGB**, respectivamente), mientras que las restantes recibieron agua como vehículo (**Esquema 10**). Al día 21 de gestación, un día antes del parto, se les practicó la eutanasia a las madres para la obtención de las placentas, los fetos y tejidos necesarios para los posteriores estudios.

Ganancia de peso durante la gestación. Parámetros maternos al día 21 de gestación.

Las ratas del grupo DG comenzaron la preñez con un 13% de sobrepeso respecto del grupo CT. La diferencia de peso entre el grupo CT y DG se mantuvo a lo largo de toda la gestación (CT vs DG, $p < 0,05$) (**Fig. 3A**). No encontramos diferencias en la

ganancia de peso durante la gestación entre todos los grupos en estudio (**Fig. 3B**). Al día 21 de gestación, día de la eutanasia, encontramos que los dos grupos alimentados con dieta rica en grasas presentan un peso mayor a los dos grupos alimentados con dieta estándar (CT vs DG y CTB vs DGB, $p<0,05$) (**Tabla 6**). Asimismo, el tratamiento con butirato tampoco indujo diferencias de peso materno al día 21 de gestación (**Tabla 6**).



Al día 21 de gestación observamos un incremento en el número de fetos en el grupo DG respecto del grupo CT, y en el grupo DGB respecto de los grupos CT y CTB (CT vs DG, CT vs DGB y CTB vs DGB, $p<0,05$) (**Tabla 6**). Llamativamente, el tratamiento con butirato, tanto en el grupo CT como en el grupo DG, induce una tendencia a incrementar el número de fetos (**Tabla 6**). No se observaron diferencias significativas en la proporción de fetos hembra y machos entre los distintos grupos experimentales (**Tabla 6**). Además, no observamos diferencias significativas en el número de reabsorciones, aunque parecería haber una tendencia del tratamiento con butirato a

disminuir las mismas en el grupo CT (**Tabla 6**). En cuanto al índice hepático materno (peso del hígado/ peso corporal x 100), vimos que presentó una disminución en ambos grupos de dieta grasa, DG y DGB (CT vs DG y CTB vs DGB, $p<0,05$) (**Tabla 6**). Además, observamos que el peso relativo del tejido adiposo abdominal (peso tejido adiposo abdominal/peso corporal x 100) de las madres a término se encontraba incrementado tanto en el grupo DG como en el grupo DGB (CT vs DG y CTB vs DGB, $p<0,05$) (**Tabla 6**).

MADRES d21	CT	CTB	DG	DGB
Peso corporal materno (g)	420,0±7,6 a	426,9±7,6 ab	458,3±7,4 bc	477,0±18,0 c
Número de fetos (n)	13,0±0,5 a	14,7±0,6 ab	15,6±0,7 bc	17,6±0,6 c
Porcentaje fetos hembra (%)	45,8±2,9 a	46,5±4,8 a	48,8±4,0 a	55,5±7,2 a
Reabsorciones (n)	1,8±0,4 a	0,7±0,3 a	1,1±0,4 a	0,8±0,4 a
Índice hepático materno (%)	4,1±0,7 a	4,1±0,1 a	3,6±0,1 b	3,5±0,1 b
Peso tejido adiposo materno relativo (%)	2,4±0,06 a	2,5±0,21 a	3,8±0,39 b	3,9±0,40 b

Tabla 6. Parámetros maternos al día 21 de gestación. Peso corporal materno, número de fetos, porcentaje de fetos hembra, número de reabsorciones, índice hepático materno y peso del tejido adiposo materno relativo al peso corporal provenientes del grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo ratas control tratadas con butirato (CTB, n=6), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de dos factores, post test Bonferroni.

Parámetros plasmáticos en la madre al día 21 de gestación. Glucemia, trigliceridemia y colesterolemia.

Evaluamos distintos parámetros en el plasma de las madres al día 21 de gestación. No se observaron diferencias significativas en la glucemia a término entre los grupos (**Fig. 4A**). En cuanto a los lípidos circulantes, observamos un incremento en la trigliceridemia en el grupo DG (CT vs DG, $p<0,05$) que fue prevenida por el tratamiento con butirato durante la gestación (DG vs DGB, $p<0,05$) (**Fig. 4B**), sin observarse cambios en el grupo CTB. Además, la colesterolemia no presentó diferencias significativas entre los grupos

(Fig. 4C). Se evaluaron los niveles circulantes de IL-1 β en las madres a término, un marcador de inflamación a nivel sistémico, y observamos un incremento de los niveles de IL-1 β en el grupo DG (CT vs DG, $p<0,05$) que fue prevenido por el tratamiento con butirato (DG vs DGB, $p<0,05$) (Fig. 4D).

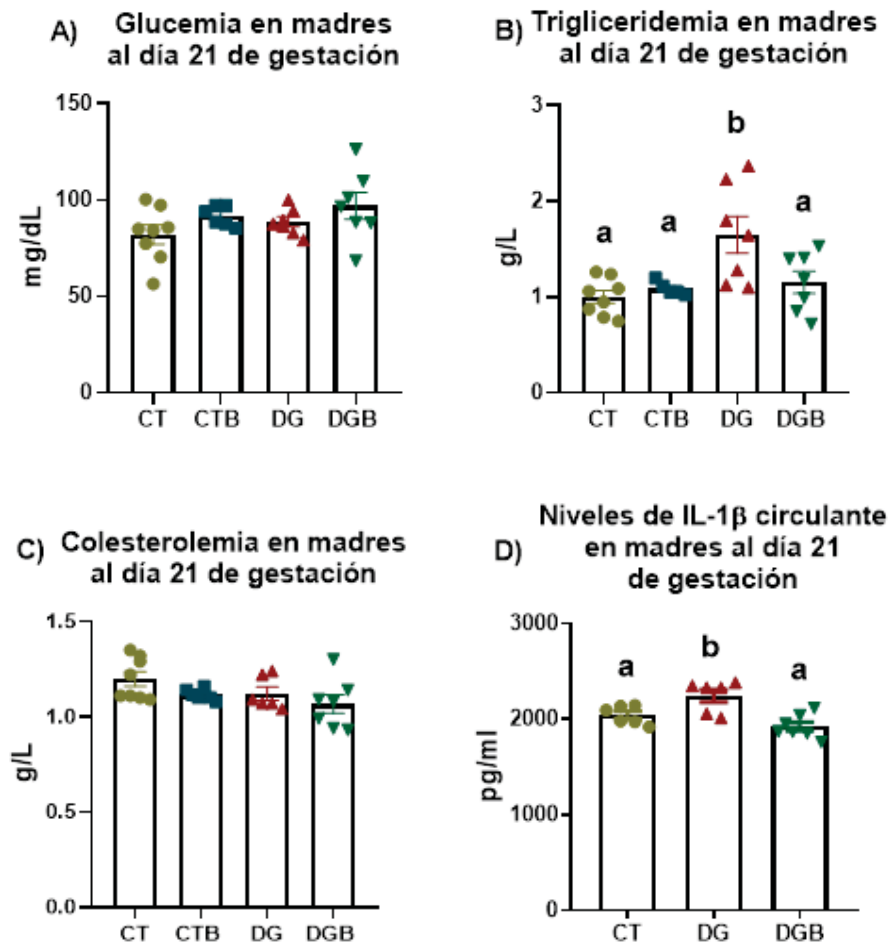


Figura 4. Parámetros plasmáticos en la rata gestante de 21 días de gestación. Niveles plasmáticos de A) glucosa, B) triglicéridos, C) colesterol y D) IL-1 β en ratas gestantes de 21 días de gestación del grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo de ratas control tratadas con butirato (CTB, n=6), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de dos factores, post test Bonferroni (A-C) y Anova de un factor, post test Tukey (D).

Parámetros fetales al día 21 de gestación.

Al día 21 de gestación, un día antes del parto, se les practicó la eutanasia a las madres para la obtención de los fetos, las placentas y los tejidos fetales, registrando su peso para evaluar el crecimiento. Observamos que los fetos provenientes de las madres DG presentaban un mayor peso en ambos sexos, que fue prevenido por el tratamiento materno con butirato (CT vs DG y DG vs DGB, $p<0,05$) (**Tabla 7**). En cambio, los fetos del grupo CTB no presentaron diferencias significativas respecto al grupo CT (**Tabla 7**).

Observamos que el sobrepeso materno indujo una disminución del peso placentario tanto en el grupo DG como DGB con respecto al control (CT vs DG y CT vs DGB, $p<0,05$) (**Tabla 7**). No observamos diferencias significativas en el índice hepático fetal entre los grupos experimentales, pero el peso relativo del intestino fetal presentó una disminución en las hembras del grupo DGB respecto del grupo DG y en los machos en el grupo CTB respecto del grupo CT (DG vs GDB y CT vs CTB respectivamente, $p<0,05$) (**Tabla 7**). Pudimos evidenciar que la disminución del peso placentario podría estar relacionada al número de fetos ya que observamos una correlación negativa entre ambos parámetros (**Fig. 5**).

FETOS d21		CT	CTB	DG	DGB
Peso corporal fetal (g)	HEMBRA	3,15±0,06 a	2,98±0,04 a	3,38±0,04 b	3,16±0,07 a
	MACHO	3,23±0,03 a	3,12±0,08 a	3,50±0,05 b	3,22±0,06 a
Peso placenta (mg)	HEMBRA	556,9±12,0 a	507,8±17,3 ab	498,4±9,8 b	485,7±10,0 b
	MACHO	583,7±10,0 a	570,9±23,2 a	513,6±97 b	481,6±11,0 b
Peso hígado fetal relativo (%)	HEMBRA	9,01±0,11 a	8,53±0,27 a	8,95±0,10 a	8,63±0,21 a
	MACHO	8,92±0,12 a	8,31±0,20 a	8,82±0,14 a	8,47±0,31 a
Peso intestino fetal relativo (%)	HEMBRA	2,78±0,05 ab	2,68±0,04 ab	2,88±0,08 a	2,63±0,04 b
	MACHO	2,71±0,04 a	2,46±0,03 b	2,72±0,05 a	2,62±0,05 ab

Tabla 7. Parámetros fetales al día 21 de gestación. Peso corporal fetal, peso placentario, peso del hígado e intestino fetal relativo al peso fetal corporal provenientes del grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo de ratas control tratadas con butirato (CTB, n=6), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de dos factores, post test Holm-Sidak.

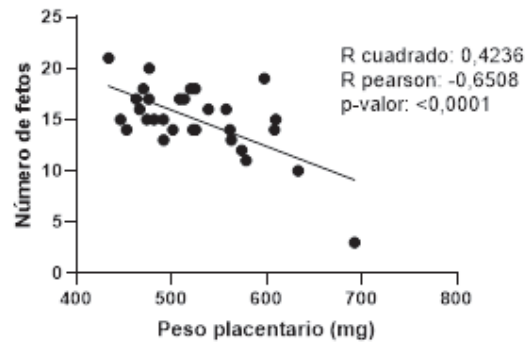


Figura 5. Número de fetos vs. Peso placentario. Prueba de correlación entre el número de fetos y el peso placentario al día 21 de gestación del grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo de ratas control tratadas con butirato (CTB, n=6), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Se presenta el R cuadrado, el R Pearson y el p-valor de la prueba.

Conclusiones Capítulo 1:

Evidenciamos que la dieta rica en grasas saturadas induce un sobrepeso de 13% en las ratas de manera previa a la preñez.

El sobrepeso de las ratas DG se mantuvo durante la gestación y en el momento de la eutanasia. Dicho sobrepeso es aparentemente debido al mayor peso del tejido adiposo. Además, observamos un incremento de la trigliceridemia que subraya el efecto de la dieta sobre la biodisponibilidad de lípidos, importante para el transporte al feto en desarrollo. El incremento en los niveles de IL-1 β podría indicar inflamación a nivel sistémico. El incremento en la biodisponibilidad de lípidos y en los niveles de IL-1 β son características de la fisiopatología de la obesidad y el sobrepeso, y afectan el desarrollo feto-placentario. Además, el sobrepeso materno indujo un mayor peso corporal fetal, un incremento en el número de fetos y un menor peso placentario.

El tratamiento con butirato durante la gestación no tuvo efectos en las madres CT. No hubo indicadores de algún efecto nocivo para el desarrollo de los fetos y/o efectos perjudiciales en las madres a nivel macroscópico durante la gestación.

El tratamiento con butirato durante la gestación de ratas con sobrepeso logró prevenir el incremento en la trigliceridemia materna, en los niveles de IL-1 β y el sobrepeso fetal. La prevención de estas alteraciones podría indicar una mejora en el programa metabólico de los fetos del modelo en estudio.

En ausencia de efectos indeseados, decidimos continuar estudiando los efectos adversos del sobrepeso materno y si el tratamiento con butirato lograba prevenir o atenuar dichas alteraciones tanto en las madres como en los fetos.

CAPÍTULO 2: Efecto del sobrepeso materno y del tratamiento con butirato durante la gestación en el hígado materno al día 21 de gestación.

El hígado es un órgano central para el metabolismo lipídico. En condiciones de alteraciones metabólicas, los lípidos pueden acumularse patológicamente en distintos tejidos, entre ellos el hígado (Cusi, 2012; Marseglia et al., 2014). Una de las principales manifestaciones hepáticas en pacientes con obesidad es el hígado graso, caracterizado por presentar acumulación excesiva de lípidos, vacuolización e infiltración de células inmunes, entre otras (Mendez-Sanchez et al., 2018). Por otra parte, este órgano es clave en la distribución de lípidos y es donde se metabolizan sustancias propias y exógenas, y cobra especial relevancia durante la gestación. El hígado materno metaboliza hormonas esteroideas y metabolitos fetales, y recibe, metaboliza y esterifica lípidos en lipoproteínas, que transportan los lípidos al feto en desarrollo.

Debido a que las ratas con sobrepeso presentaban una disminución del índice hepático y un incremento en los niveles de triglicéridos plasmáticos en las madres, y que el butirato logró prevenir la hipertrigliceridemia, decidimos evaluar la salud metabólica del hígado materno en los distintos grupos en estudio.

Contenido lipídico en el hígado de las madres al día 21 de gestación.

Evaluamos el contenido lipídico mediante cromatografía en capa delgada (TLC), diferenciando cinco especies lipídicas, para dilucidar si el sobrepeso materno inducía un incremento en la acumulación de lípidos y cuál era el efecto del tratamiento con butirato. Observamos una sobreacumulación hepática de lípidos en las madres DG, en ésteres de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres (CT vs DG, $p < 0,05$) (**Fig. 6**). Llamativamente, el tratamiento materno con butirato acentúa la acumulación de ésteres de colesterol y triglicéridos únicamente, probablemente a expensas de los ácidos grasos libres que presentan una tendencia a disminuir con respecto a los hígados de las madres DG (DG vs DGB, $p < 0,05$) (**Fig. 6**). Por otro lado, en el grupo CTB no se observaron diferencias significativas con el CT (**Fig. 6**).

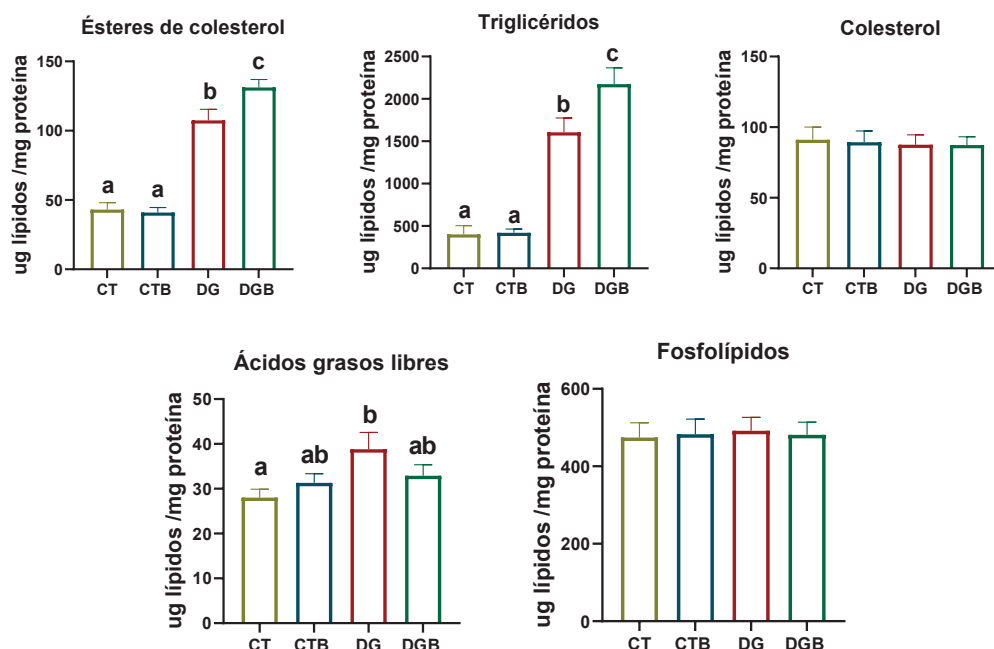


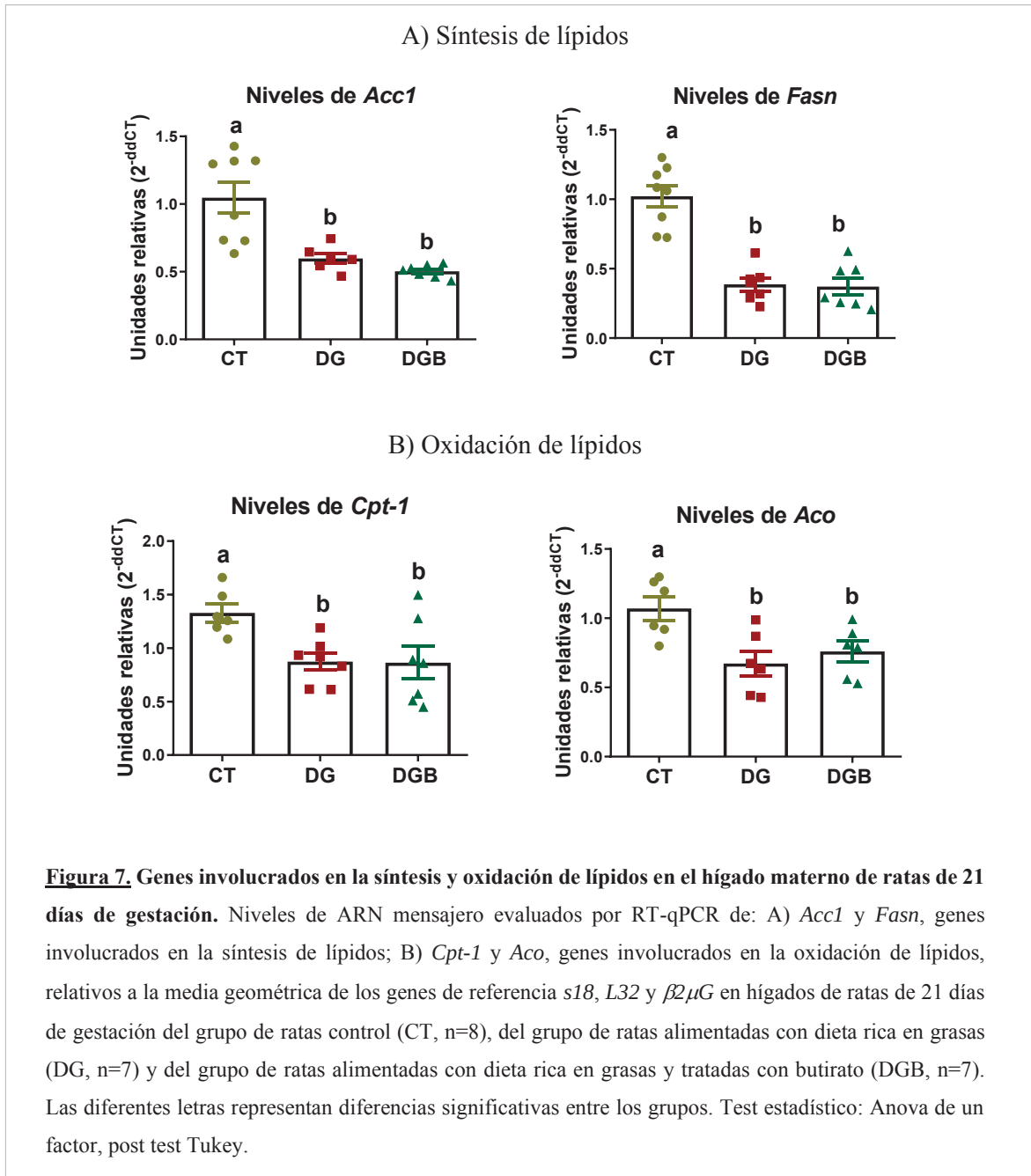
Figura 6. Contenido lipídico en el hígado materno de ratas de 21 días de gestación. Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en el hígado de ratas de 21 días de gestación del grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo de ratas control tratadas con butirato (CTB, n=6), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de dos factores, post test Tukey.

Niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo lipídico en el hígado materno al día 21 de gestación.

Dados los efectos del sobrepeso y el tratamiento con butirato sobre los triglicéridos circulantes y el contenido lipídico en el hígado materno, decidimos evaluar los niveles de ARN mensajero de genes involucrados en distintas vías del metabolismo lipídico. Y, dado que en el grupo CT no observamos diferencias en la trigliceridemia o el contenido lipídico del hígado materno por el tratamiento con butirato, decidimos realizar el análisis en los grupos CT, DG y DGB.

Observamos que tanto en el grupo DG como en el DGB los niveles de *Acc1* y *Fasn*, dos enzimas clave que catalizan la síntesis de lípidos, y de *Cpt-1* y *Aco*, enzimas lipolíticas clave en los procesos de β -oxidación mitocondrial y peroxisomal,

respectivamente, se encontraban disminuidos (CT vs DG y CT vs DGB, $p < 0,05$) (**Fig. 7A y 7B**).



El sobrepeso materno también induce una disminución en los niveles de ARN mensajero de *Cd36*, conocido como *Fat* (translocasa de ácidos grasos) (CT vs DG, $p < 0,05$) (**Fig. 8**). El tratamiento materno con butirato no previno dicha disminución (DG vs DGB) (**Fig. 8**). Los niveles de *Lpl*, enzima que hidroliza lípidos complejos contenidos

en lipoproteínas a ácidos grasos para internalizarlos, presentaron una tendencia a disminuir debido al sobrepeso materno (CT vs DG y CT vs DGB, $p=0,09$) (**Fig. 8**). De manera interesante, los niveles de ARN mensajero de *Lpl* presentaron una correlación negativa con la trigliceridemia materna ($p<0,05$) (**Fig. 8**).

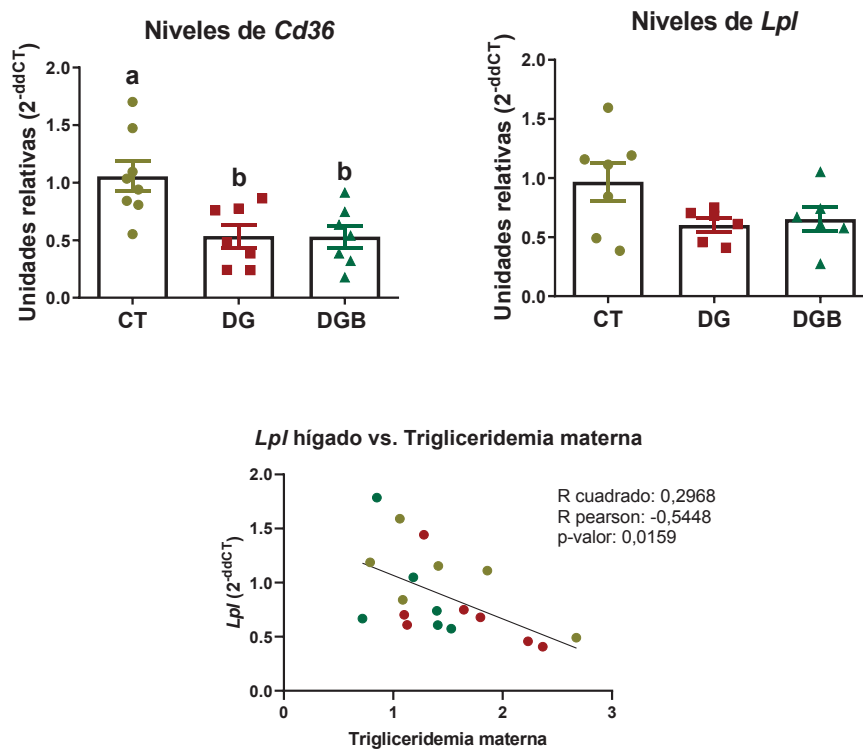


Figura 8. Genes involucrados en el transporte e internalización de lípidos en el hígado de ratas de 21 días de gestación. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de *Cd36* y *Lpl* relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$, junto con la prueba de correlación entre los niveles de ARN mensajero de *Lpl* y trigliceridemia materna, en hígados de ratas de 21 días de gestación del grupo de ratas control (CT, $n=8$), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, $n=7$) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, $n=7$). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

Los niveles de *Pparg*, un factor de transcripción vinculado con la adipogénesis, no presentaron diferencias significativas entre los grupos en estudio (**Fig. 9**). El sobrepeso materno no tuvo efectos sobre los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c*, sin embargo, el tratamiento con butirato en el contexto de sobrepeso indujo un incremento en los niveles de este factor de transcripción, cuyos genes blanco están asociados a la síntesis de

lípidos y cuya transcripción es sensible a insulina (CT vs DGB, $p < 0,05$) (**Fig. 9**). Además, los niveles de *Srebp-1c* correlacionaron negativamente con la trigliceridemia materna (**Fig. 9**).

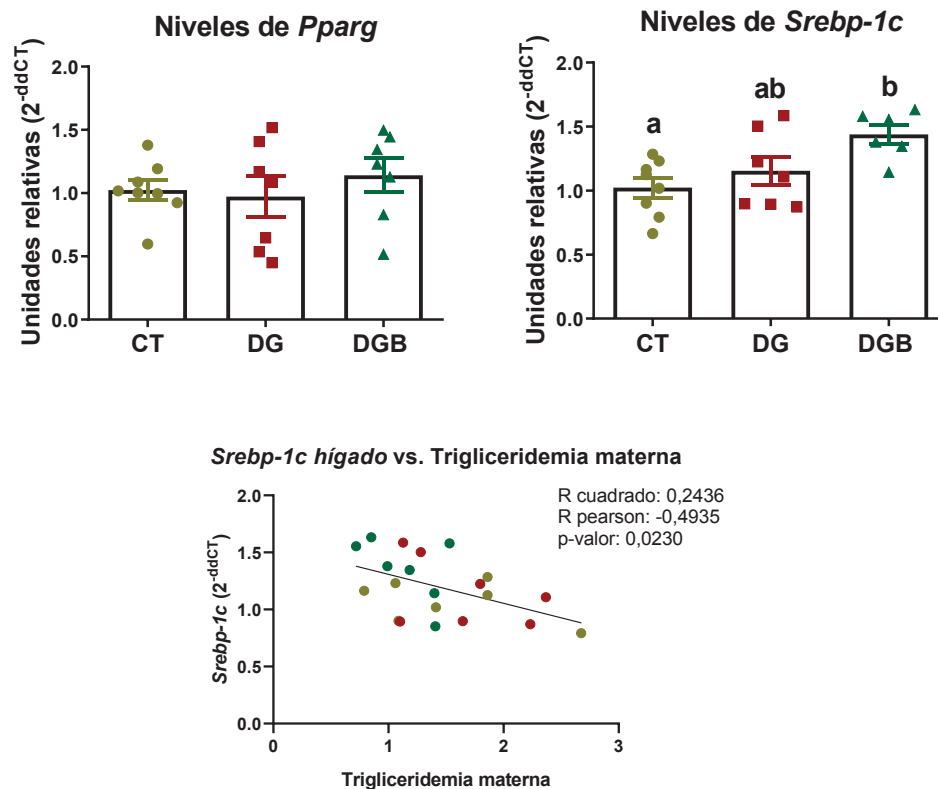


Figura 9. Factores de transcripción involucrados en el metabolismo lipídico en el hígado de ratas de 21 días de gestación. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de *Srebp-1c* y *Pparg* relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$, junto con la prueba de correlación entre los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c* y trigliceridemia materna, en hígados de ratas de 21 días de gestación del grupo de ratas control (CT, $n=8$), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, $n=7$) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, $n=7$). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

Conclusiones capítulo 2:

El sobrepeso materno aumenta los niveles de lípidos hepáticos en la madre, probablemente debido al incremento en la disponibilidad y alteraciones como la disminución de las enzimas de oxidación, *Aco* y *Cpt-1*. Tal vez por eso, enzimas de las vías de síntesis e internalización de lípidos se encontraron deprimidas.

El tratamiento materno con butirato no tiene efecto sobre la acumulación lipídica hepática materna en el grupo CT, sin embargo, en el grupo DG, induce un incremento aún mayor de triglicéridos y ésteres de colesterol, probablemente a expensas de una disminución en los ácidos grasos libres tisulares. Estos efectos parecen estar mediados por el incremento de *Srebp-1c*, cuyos efectos anabólicos conocidos permitirían la esterificación de ácidos grasos en moléculas más estables como triglicéridos y ésteres de colesterol.

Fue llamativo que el tratamiento materno con butirato, que probó tener efectos beneficiosos en los fetos y disminuyó la trigliceridemia materna, acentúe la acumulación de lípidos hepáticos. Estos resultados indicarían que la salud metabólica de la gestante con obesidad estaría comprometida luego del tratamiento con butirato. Es por ello que en este trabajo continuamos evaluando el efecto del tratamiento con butirato sobre la salud de la madre luego del destete.

CAPÍTULO 3: Efecto del sobrepeso materno y del tratamiento con butirato durante la gestación en las placentas al día 21 de gestación.

La placenta es el órgano clave para la nutrición del feto en desarrollo. Ésta, censa el entorno intrauterino y las necesidades fetales, y responde para proporcionar los nutrientes desde la madre al feto. La placenta es capaz de recibir, acumular y transportar los lípidos desde la sangre materna al feto (Lewis and Desoye, 2017; Lewis et al., 2018; Duttaroy and Basak, 2022). Con el propósito de estudiar el efecto del sobrepeso materno y el tratamiento con butirato en el metabolismo lipídico placentario, se utilizaron las placentas de los fetos al día 21 gestacional de los distintos grupos en estudio, diferenciándolas por el sexo del feto.

Contenido lipídico en las placentas al día 21 de gestación.

Como vimos un incremento en los triglicéridos plasmáticos en las madres DG al día 21 de gestación, decidimos evaluar el contenido placentario de lípidos. Las placentas del grupo CTB no presentaron diferencias significativas en los niveles de las distintas especies lipídicas al compararlas con las del grupo CT, ni en las provenientes de fetos hembra (**Fig. 10**) ni de fetos macho (**Fig. 11**) (CT vs CTB). Observamos que las placentas, tanto del grupo DG como DGB, presentaban sobreacumulación de lípidos (**Fig. 10 y 11**). En particular, en las placentas de fetos hembra provenientes del grupo DG observamos un incremento en triglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos y colesterol, que persistió en el grupo DGB (CT vs DG y CTB vs DGB, $p<0,05$) (**Fig. 10**). Por el otro lado, en las placentas de fetos macho del grupo DG vimos una sobreacumulación de las 5 especies lipídicas que persistió en el grupo DGB (CT vs DG y CTB vs DGB, $p<0,05$) (**Fig. 11**). Más aún, con el tratamiento materno con butirato el contenido de triglicéridos y ésteres de colesterol se incrementó por sobre los niveles encontrados en las placentas de fetos macho del grupo DG (DG vs DGB, $p<0,05$) (**Fig. 11**).

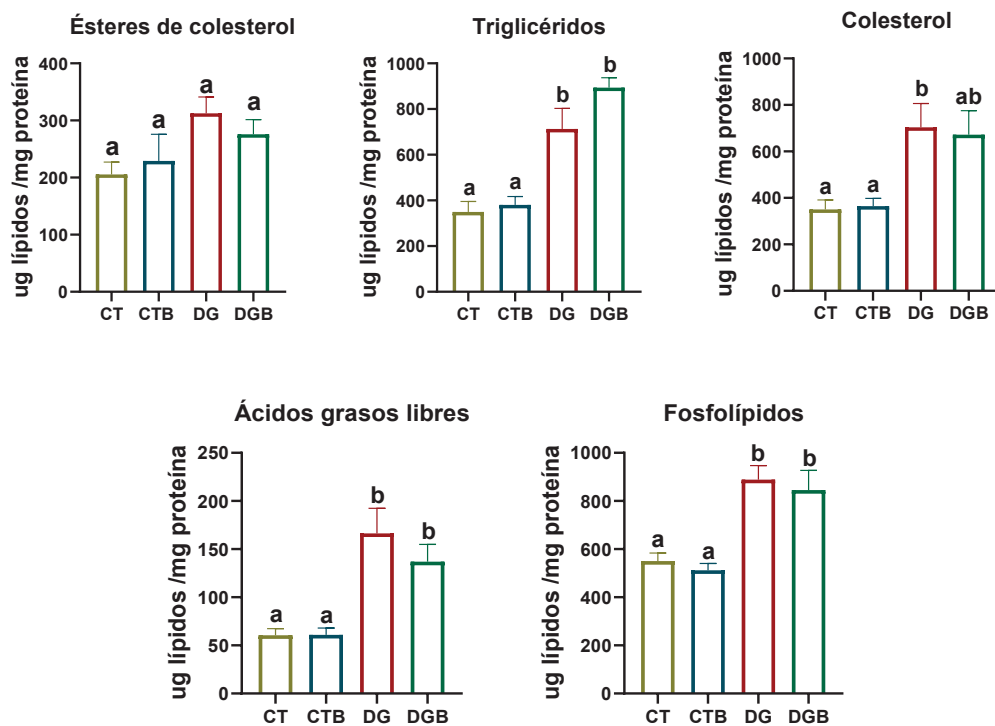


Figura 10. Contenido lipídico en placenta de fetos hembra en el día 21 de gestación. Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en placentas de fetos hembra al día 21 de gestación provenientes del grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo de ratas control tratadas con butirato (CTB, n=6), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de dos factores, post test Tukey.

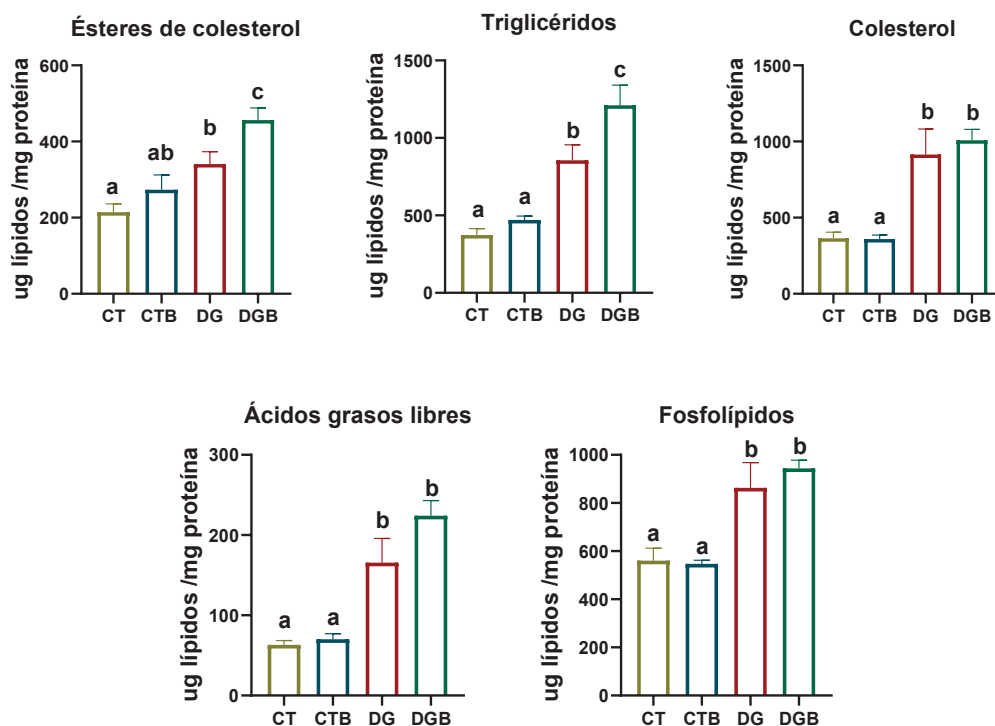


Figura 11. Contenido lipídico en placentas de fetos macho en el día 21 de gestación. Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en placentas de fetos macho al día 21 de gestación provenientes del grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo de ratas control tratadas con butirato (CTB, n=6), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de dos factores, post test Tukey.

Niveles de proteínas involucradas en el metabolismo lipídico en placentas al día 21 de gestación.

Se evaluaron los niveles de distintas proteínas involucradas en el metabolismo lipídico en las placentas. La proteína PLIN2 es un componente periférico estructural de las gotas lipídicas, necesario para la formación y el mantenimiento de las gotas de almacenamiento de lípidos. Observamos un incremento de los niveles de PLIN2 en las placentas de fetos hembra DG, y de fetos hembra y macho DGB (CT vs DG y CT vs DGB, $p < 0,05$) (**Fig. 12**). Como se nombró anteriormente, CD36 es un transportador de ácidos grasos que une los ácidos grasos de cadena larga y facilita su transporte al interior de las células. El sobrepeso materno no indujo diferencias en la expresión de CD36 en las placentas de fetos hembra y macho (**Fig. 12**). El butirato produjo un incremento en los

niveles placentarios de CD36 con respecto al CT (CT vs DGB, $p<0,05$) en machos, y un incremento con respecto tanto al CT como al DG en hembras (CT vs DGB y DG vs DGB, $p<0,05$) (**Fig. 12**). La proteína FABP4 es un transportador de lípidos citoplasmático al que se unen ácidos grasos de cadena larga y ácido retinoico. Observamos un incremento en los niveles proteicos de FABP4 en placentas de ambos sexos en el grupo DG y el tratamiento materno con butirato logró llevar los niveles a valores similares al control en el grupo DGB (CT vs DG, $p<0,05$ y CT vs DGB) (**Fig. 12**).

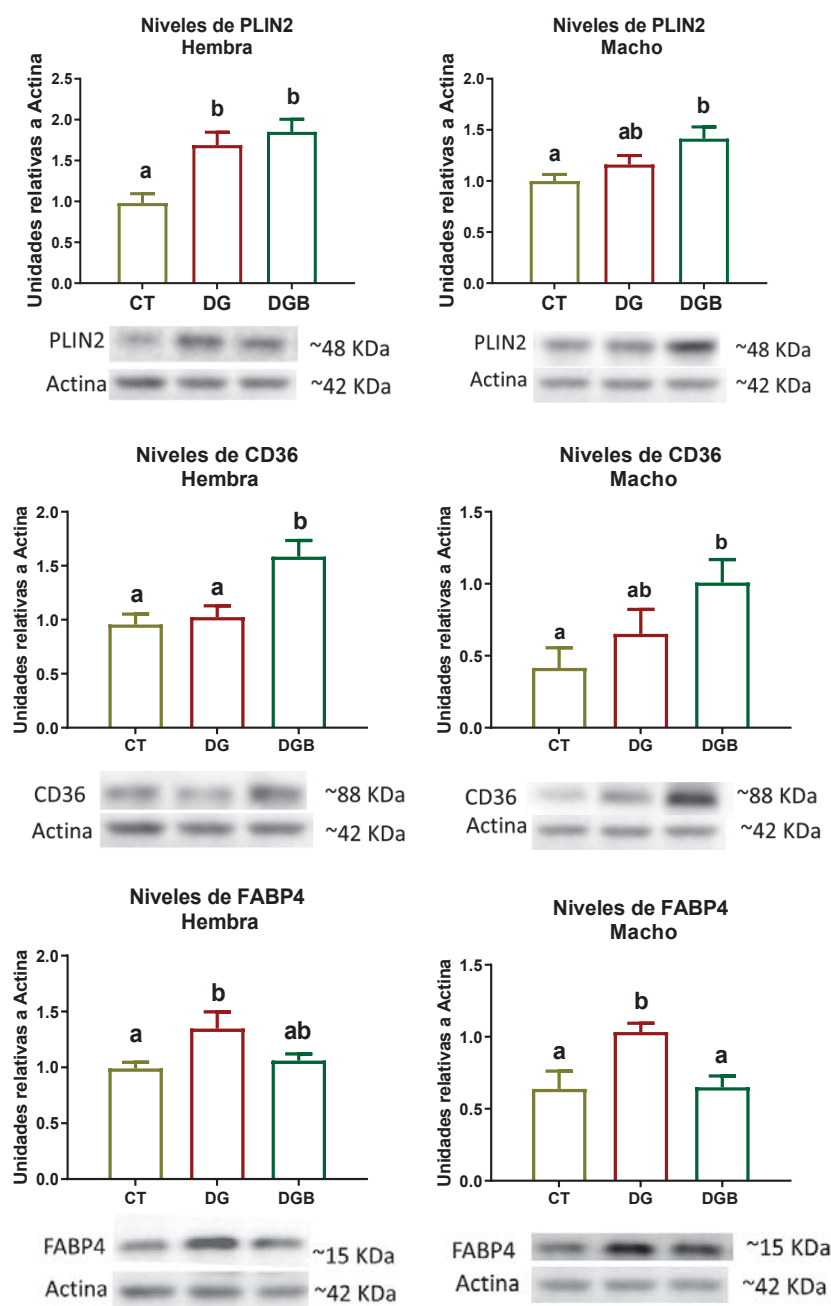


Figura 12. Niveles de proteínas involucradas en el metabolismo lipídico en placentas al día 21 de gestación. Niveles proteicos de: A) PLIN2, B) CD36 y C) FABP4 evaluados por Western blot relativos a actina en placentas de fetos hembra y macho al día 21 de gestación del grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

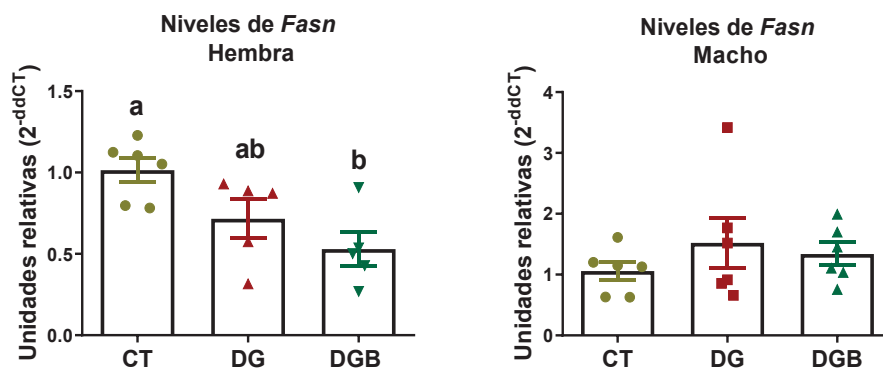
Niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo lipídico en placentas de ratas al día 21 de gestación.

Además, decidimos evaluar los niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo lipídico en las placentas.

➤ Síntesis y oxidación de lípidos.

Observamos que la obesidad materna no indujo cambios en los niveles de ARN mensajero de *Fasn*, *Aco* y *Cpt-1* en las placentas de fetos hembra y macho (CT vs DG) (**Fig. 13**). Al evaluar el efecto del butirato observamos que los niveles de *Fasn*, enzima clave en la síntesis de lípidos, presentaban una disminución en las placentas hembra del grupo DGB (CT vs DGB, $p < 0,05$), mientras que las placentas de los machos no presentaron diferencias (**Fig. 13A**). Evaluamos los niveles de ARN mensajero de dos enzimas claves en la β -oxidación de ácidos grasos, *Aco* y *Cpt-1*. Observamos que, en el grupo DGB, los niveles de ARN mensajero de *Aco* se encontraban disminuidos en las placentas de fetos hembra e incrementados en las placentas de fetos macho (CT vs DGB, $p < 0,05$). Por otro lado, los niveles de ARN mensajero de *Cpt-1* no presentaron diferencias en ninguno de los dos sexos entre los grupos en estudio (**Fig. 13B**).

A) Síntesis de lípidos



B) Oxidación de lípidos

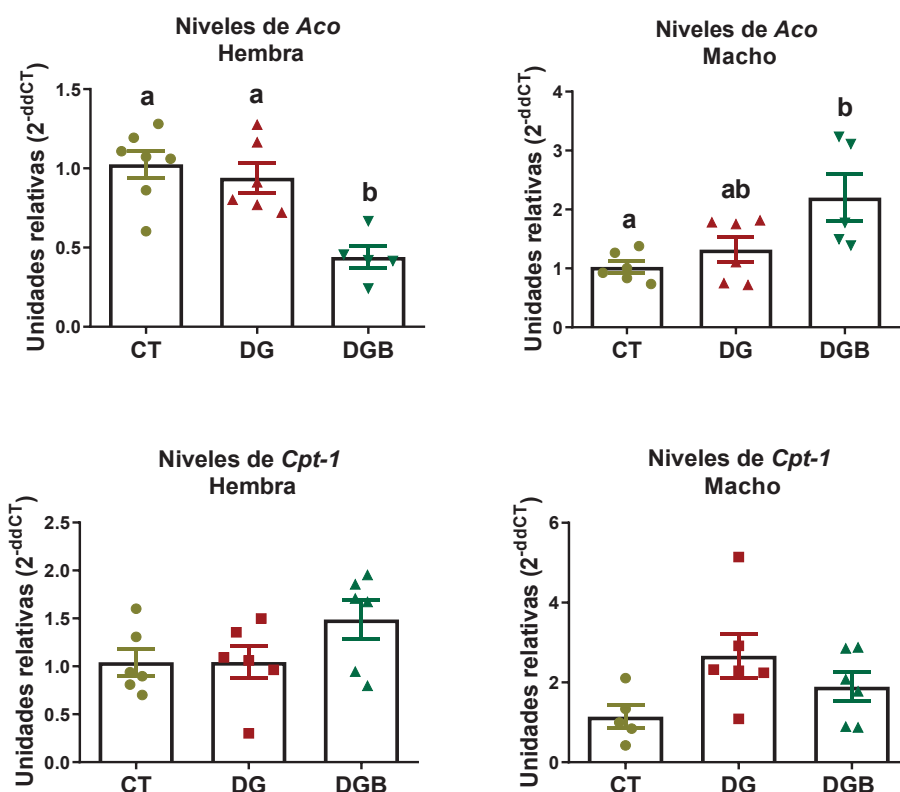


Figura 13. Genes involucrados en la síntesis y oxidación de lípidos en placentas al día 21 de gestación.

Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de: A) *Fasn*, involucrados en la síntesis de lípidos; B) *Aco* y *Cpt-1*, genes involucrados en la oxidación de lípidos, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en placentas de fetos hembra y macho al día 21 de gestación provenientes del grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

➤ Transporte e internalización de lípidos.

Analizamos los niveles de varios genes involucrados al transporte e internalización de lípidos. Encontramos varios efectos dependientes del sexo, tanto en el grupo CT como DG.

En las placentas hembra, el grupo DG presentó un incremento en los niveles de ARN mensajero de *Lpl* (CT vs DG, $p<0,05$) y no se observaron cambios en los niveles de *Cd36*, *Lipg* y *Fatp-1* (**Fig. 14**). El tratamiento con butirato normalizó los niveles de *Lpl* en el grupo DGB (DG vs DGB, $p<0,05$) (**Fig. 14A**). Llamativamente, aunque no hay diferencias entre el grupo CT y DG, encontramos que el tratamiento con butirato incrementa los niveles de ARN mensajero de *Cd36* tanto en el grupo CT como en el grupo DG (CT vs CTB y DG vs DGB, $p<0,05$) (**Fig. 14B**). No observamos diferencias en los niveles de ARN mensajero de *Fatp-1* entre los grupos en estudio (**Fig. 14C**). De manera diferente, el tratamiento con butirato incrementa los niveles de ARN mensajero de *Lipg* únicamente en las placentas de fetos hembra del grupo DGB (CT vs DGB y DG vs DGB, $p<0,05$) (**Fig. 14D**).

Por otro lado, en las placentas de fetos macho encontramos que el sobrepeso materno causa una tendencia a incrementar los niveles de ARN mensajero de *Lpl* y el tratamiento con butirato no tiene efecto sobre los controles, mientras que incrementa dichos niveles aún más en el grupo de sobrepeso (CT vs DGB, $p<0,05$) (**Fig. 15A**). Observamos una disminución en los niveles de *Cd36* en el grupo DG que fue prevenido por el tratamiento materno con butirato (CT vs DG y DG vs DGB, $p<0,05$) (**Fig. 15B**). Las placentas de fetos macho en el grupo DG no presentaron cambios en los niveles de ARN mensajero de *Fatp-1* ni *Lipg* con respecto al grupo CT (**Fig. 15C y 15D**). A diferencia de las hembras, en las placentas de fetos macho del grupo CTB no observamos diferencias significativas en *Lpl* ni en *Cd36* (**Fig. 15A y 15B**).

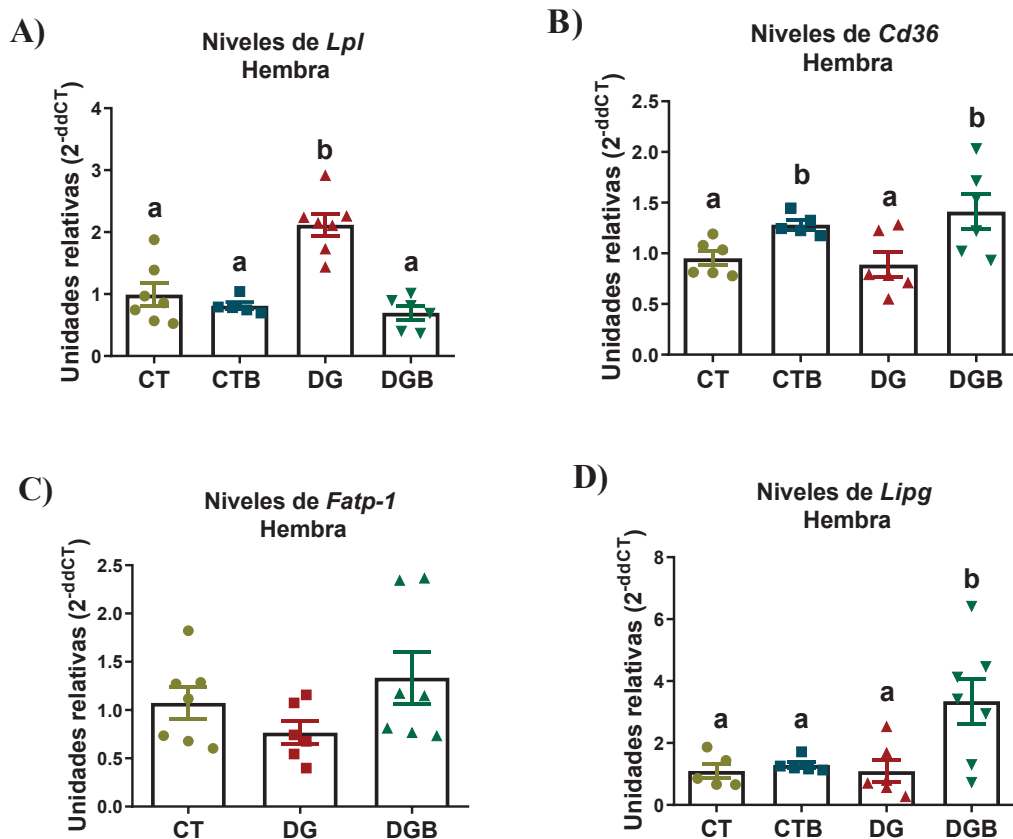


Figura 14. Genes involucrados en el transporte e internalización de lípidos en placentas de fetos hembra al día 21 de gestación. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de: A) *Lpl*, B) *Cd36*, C) *Fatp-1*, y D) *Lipg*, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en placentas de fetos hembra al día 21 de gestación provenientes del grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo de ratas control tratadas con butirato (CTB, n=6), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey o Anova de dos factores, post test Bonferroni.

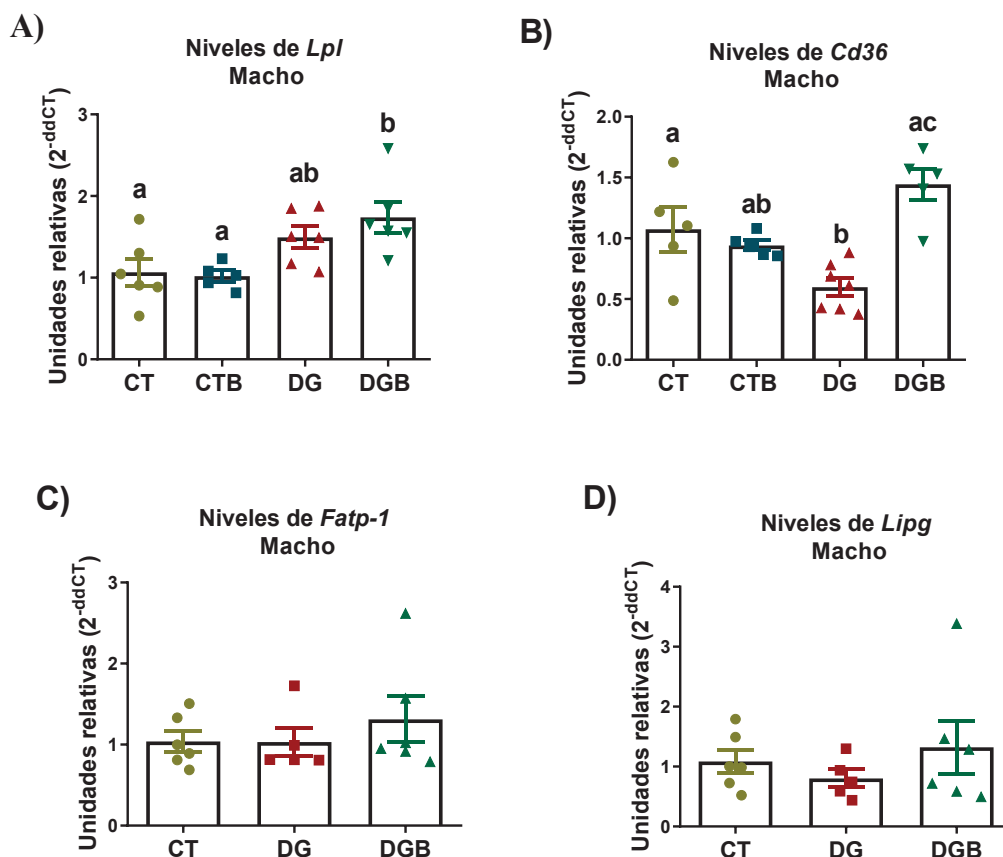
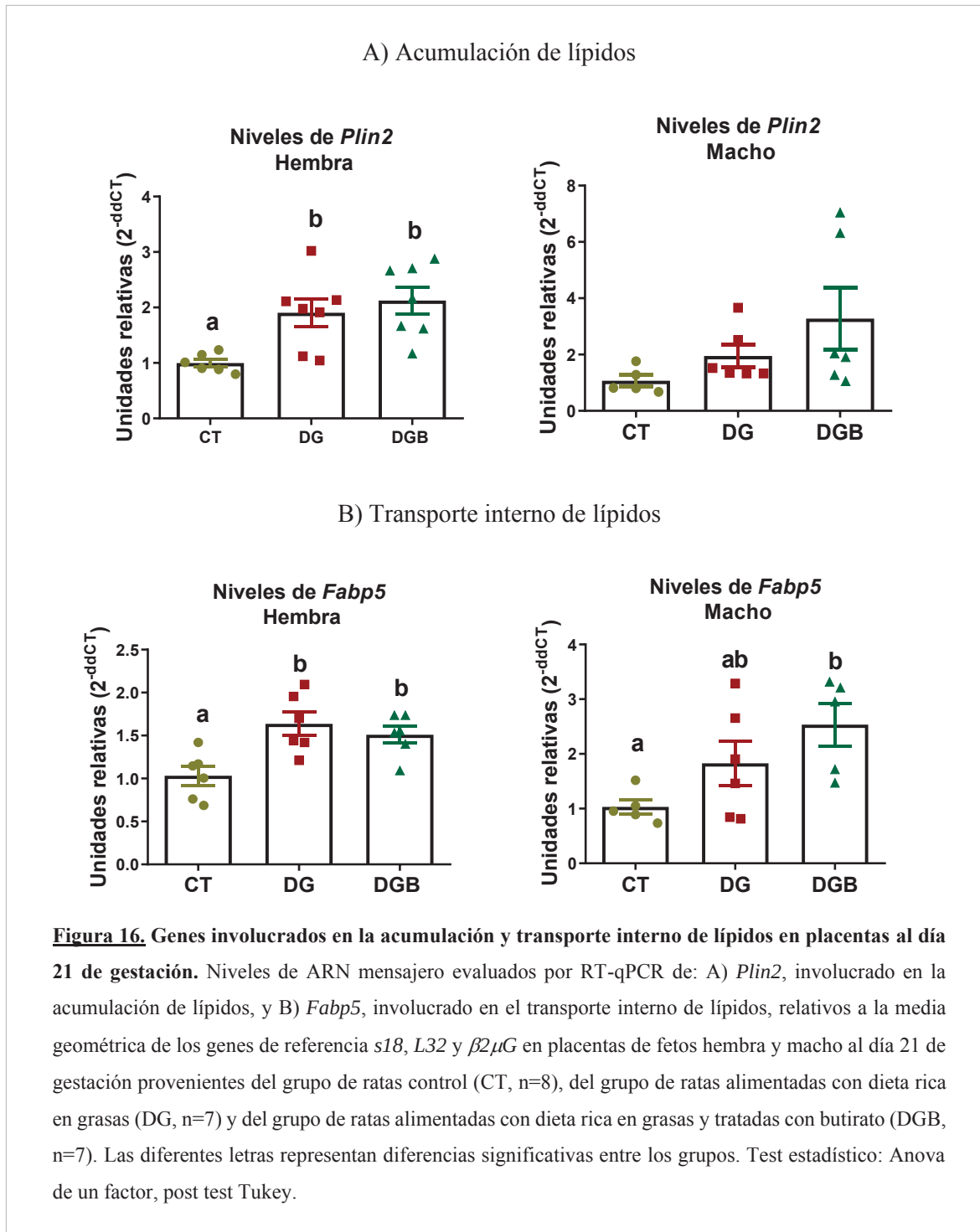


Figura 15. Genes involucrados en el transporte e internalización de lípidos en placentas de fetos macho al día 21 de gestación. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de: A) *Lpl*, B) *Cd36*, C) *Fatp-1*, y D) *Lipg*, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en placentas de fetos macho al día 21 de gestación provenientes del grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo de ratas control tratadas con butirato (CTB, n=6), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey o Anova de dos factores, post test Bonferroni.

➤ Acumulación y transporte interno de lípidos.

Evaluamos los niveles de ARN mensajero de *Plin2*, proteína formadora de las gotas lipídicas, y de *Fabp5*, transportador intracelular de ácidos grasos de cadena larga, en las placentas hembra y macho de los grupos en estudio. En las placentas hembra, observamos un incremento inducido por el sobrepeso materno de los niveles de ARN mensajero de *Plin2* y *Fabp5* (CT vs DG, $p < 0,05$), que no fue prevenido por el tratamiento con butirato (**Fig. 16**). En las placentas macho, observamos una tendencia a incrementar

los niveles de ARN mensajero de *Fabp5* inducido por el sobrepeso, y un incremento significativo inducido por el sobrepeso en conjunto con el tratamiento con butirato comparado con el CT (CT vs DGB, $p < 0,05$), sin observar diferencias significativas en los niveles de *Plin2* (Fig. 16).



Conclusiones capítulo 3:

El tratamiento con butirato en las madres CTB no provocó cambios en la acumulación de lípidos placentarios. El sobrepeso materno, en cambio, indujo un incremento de la acumulación lipídica que persiste en las placentas de fetos hembra y se acentúa en las placentas de fetos macho con el tratamiento con butirato.

El exceso de triglicéridos plasmáticos encontrado en las madres DG, originado a partir del exceso de lípidos proveniente de la dieta, sería transferido al feto en desarrollo a través de la placenta. Observamos que parte de esos lípidos se acumula en las placentas, lo que podría prevenir un pasaje aún mayor al feto en desarrollo.

Además, las placentas pertenecientes al grupo CTB no presentaron diferencias significativas en cuanto a los niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo lipídico, a excepción de los niveles de Cd36 en las placentas hembra. Este fue el único cambio que pudimos observar en el grupo CTB, y sugiere que CD36 estaría modulado por el butirato de forma sexo-dependiente y podría ser, en parte, responsable de la acumulación de lípidos observada en el grupo de hembras DGB.

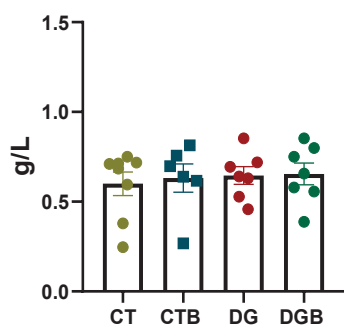
El desbalance de las vías del metabolismo lipídico que observamos en las placentas inducido por el sobrepeso materno persiste o se acentúa de manera sexo-dependiente por el tratamiento con butirato. Será de nuestro interés indagar el efecto de estas alteraciones placentarias en los fetos en desarrollo.

CAPÍTULO 4: Efecto del sobrepeso materno y del tratamiento con butirato durante la gestación en los fetos de día 21 de gestación.

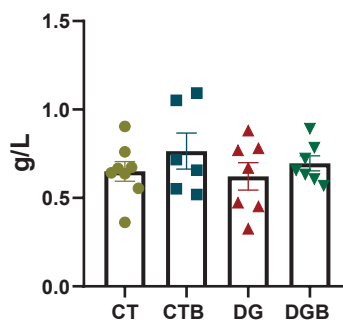
Parámetros plasmáticos fetales al día 21 de gestación. Colesterolemia, trigliceridemia y glucemia.

Al analizar los niveles de lípidos circulantes en el plasma fetal, no observamos diferencias significativas en la colesterolemia (**Fig. 17**), pero observamos una disminución en la trigliceridemia tanto en fetos hembra como macho del grupo DG (CT vs DG, $p < 0,05$) (**Fig. 17**). El tratamiento materno con butirato logró normalizar estos valores en el plasma de los fetos macho, pero no en las hembras (**Fig. 17**). No se observaron diferencias significativas por el tratamiento con butirato en el grupo CT. No observamos diferencias significativas en la glucemia fetal (**Fig. 17**).

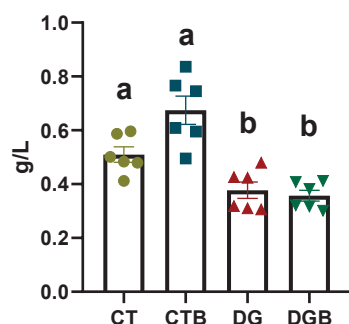
Niveles de colesterol en fetos hembra



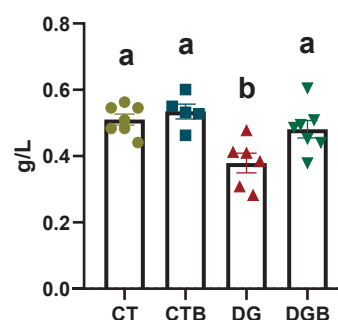
Niveles de colesterol en fetos macho



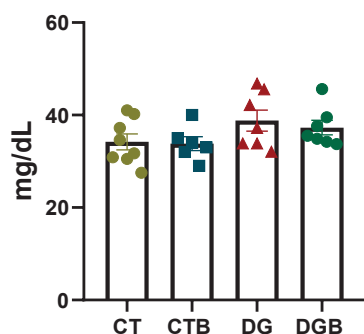
Niveles de triglicéridos en fetos hembra



Niveles de triglicéridos en fetos macho



Niveles de glucosa en fetos hembra



Niveles de glucosa en fetos macho

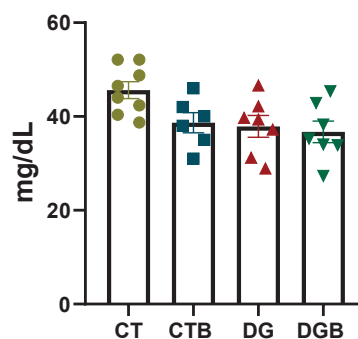


Figura 17. Parámetros plasmáticos en fetos al día 21 de gestación. Niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos y colesterol en fetos hembra y macho al día 21 de gestación provenientes del grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo de ratas control tratadas con butirato (CTB, n=6), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de dos factores, post test Tukey.

Parámetros plasmáticos fetales al día 21 de gestación. Enzimas hepáticas.

En cuanto a las enzimas hepáticas, observamos un incremento en la actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) en los fetos hembra y macho de grupo DG (CT vs DG, $p<0,05$), mientras que en el grupo DGB el tratamiento materno con butirato logró prevenir el incremento en la actividad en hembras (DG vs DGB, $p<0,05$) y parcialmente en machos (Fig. 18).

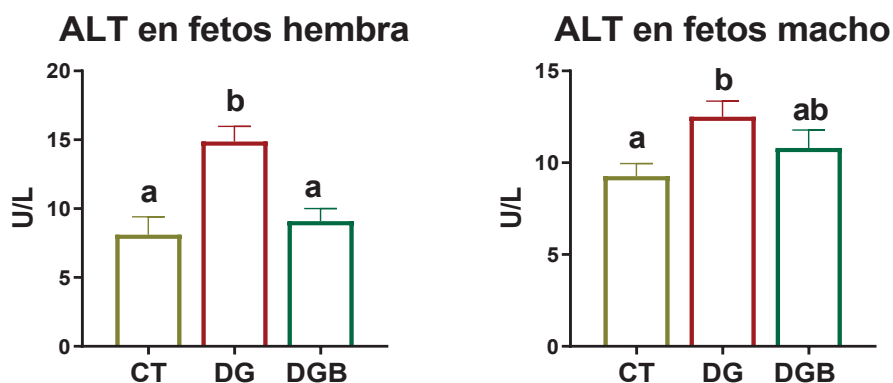


Figura 18. Enzima hepática fetales. Actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) en el plasma fetal macho y hembra al día 21 de gestación provenientes del grupo de ratas control (CT, $n=8$), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, $n=7$) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, $n=7$). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

Contenido lipídico en los hígados fetales al día 21 de gestación.

Al día 21 de gestación el feto se nutre, a través de la placenta, de la circulación materna. El exceso de trigliceridemia materna podría acumularse en la placenta para evitar el incremento en el transporte de lípidos hacia el feto en desarrollo. Sin embargo, no explica del todo la disminución en la trigliceridemia fetal. En un intento de buscar causas probables, nos enfocamos en evaluar la acumulación de lípidos en el hígado fetal, siendo el hígado un órgano clave en el metabolismo lipídico.

Mediante TLC, evaluamos el contenido de 5 especies lipídicas en el hígado fetal de los 4 grupos en estudio: CT, CTB, DG y DGB. Observamos que no había diferencias

significativas en el contenido de lípidos inducidas por el butirato en el grupo CTB (CT vs CTB) (**Fig. 19 y 20**). En cambio, el sobrepeso materno induce una sobreacumulación de ésteres de colesterol en el hígado fetal macho y de triglicéridos en el hígado fetal de machos y hembras (CT vs DG, $p<0,05$) (**Fig. 19 y 20**). Llamativamente, el tratamiento con butirato previene la sobreacumulación de lípidos observada en los fetos hembra y macho provenientes del grupo DG y disminuye los niveles de colesterol y ácidos grasos libres en las placentas de los fetos macho (DG vs DGB) (**Fig. 19 y 20**).

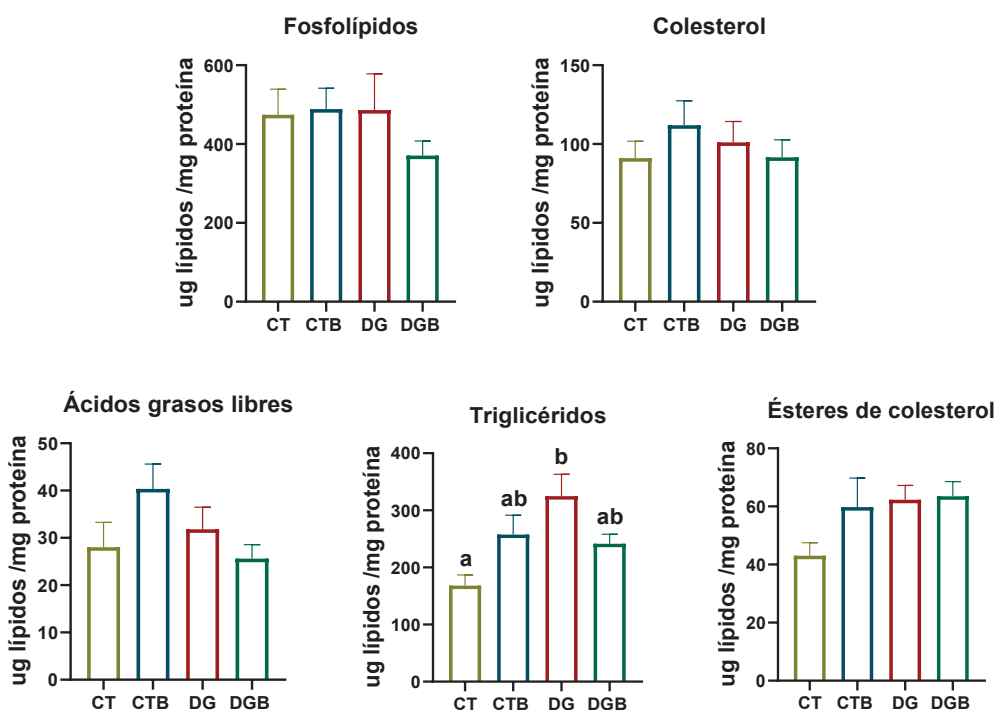


Figura 19. Contenido lipídico en hígados de fetos hembra en el día 21 de gestación. Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en hígado fetal hembra al día 21 de gestación provenientes del grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo de ratas control tratadas con butirato (CTB, n=6), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de dos factores, post test Bonferroni.

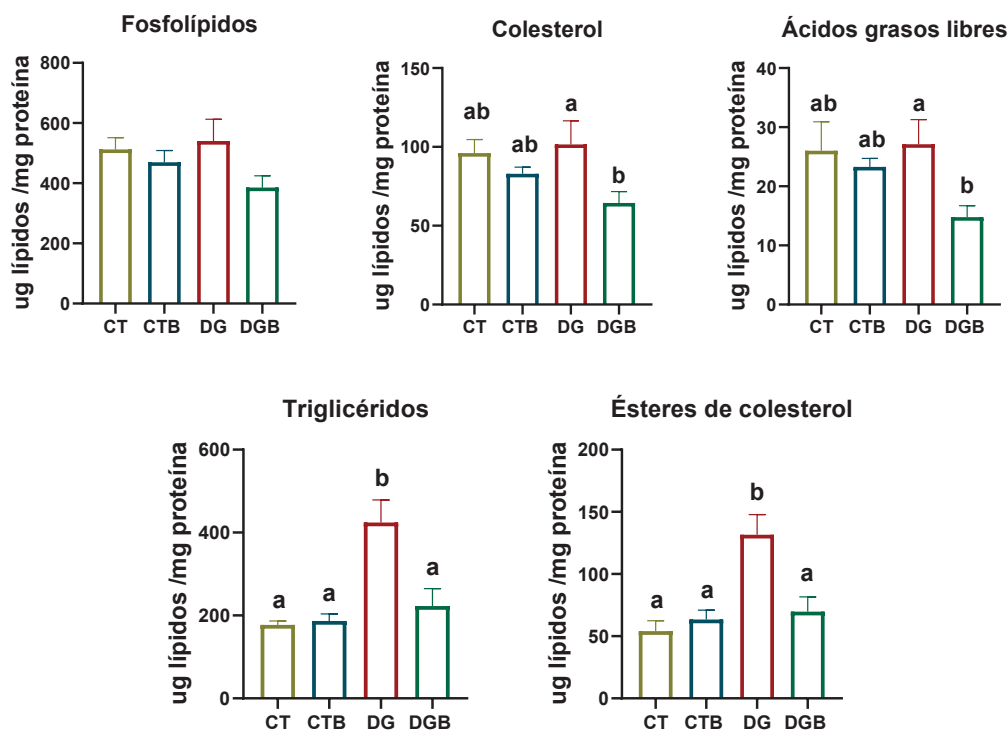


Figura 20. Contenido lipídico en hígados de fetos macho en el día 21 de gestación. Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en hígado fetal macho al día 21 de gestación provenientes del grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo de ratas control tratadas con butirato (CTB, n=6), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de dos factores, post test Bonferroni.

Niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo lipídico en los hígados fetales al día 21 de gestación.

Evaluamos los niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo lipídico en los hígados fetales al día 21 de gestación. Dado que no encontramos diferencias en la acumulación lipídica en el grupo CTB con respecto al control, no se realizó el análisis de los niveles de ARN mensajero de los genes analizados en este grupo.

➤ Síntesis y oxidación de lípidos.

En los hígados de los fetos de 21 días de gestación, evaluamos los niveles de ARN mensajero de *Acc1*, involucrado en la síntesis de lípidos; *Srebp1-c*, factor de transcripción

involucrado en procesos anabólicos; *Aco*, enzima oxidante; y *Cyp4a1*, enzima que desempeña un papel importante en el metabolismo de los ácidos grasos por ω -hidroxilación e interviene en la producción de mediadores proinflamatorios y especies reactivas del oxígeno, contribuyendo al desarrollo de EHGNA.

Los hígados de fetos hembra y macho mostraron niveles similares de ARN mensajero de *Acc1* y *Aco* entre los grupos en estudio (**Fig. 21 y 22**). Encontramos que el sobrepeso materno induce un incremento de los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c* y *Cyp4a1* en los hígados de fetos hembra y los niveles de *Srebp-1c* en los hígados de fetos macho (CT vs DG, $p < 0,05$) (**Fig. 21 y 22**). De manera interesante, el tratamiento con butirato logró prevenir los incrementos mencionados en los hígados de fetos hembra (DG vs DGB, $p < 0,05$), mientras que en los fetos macho el tratamiento con butirato acentuó el incremento en los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c* (DG vs DGB, $p < 0,05$) y no tuvo efecto sobre los niveles de *Cyp4a1* (**Fig. 21 y 22**).

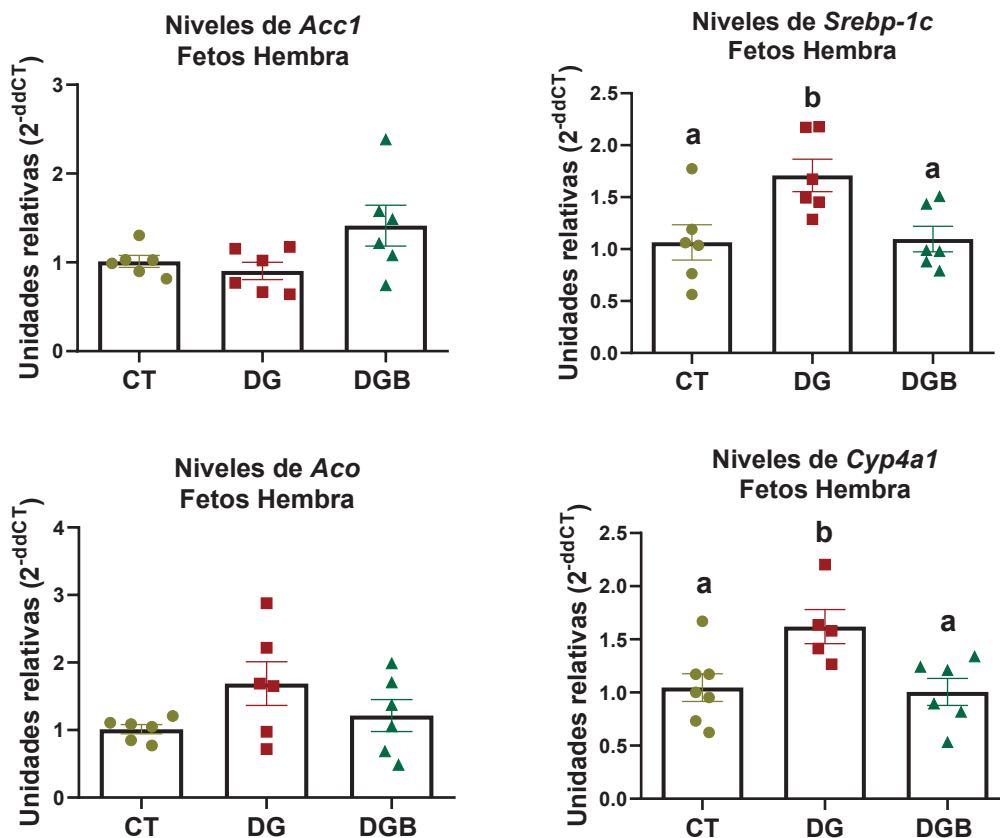


Figura 21. Genes involucrados en la síntesis y oxidación de lípidos en el hígado de fetos hembra en el día 21 de gestación. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de *Acc1* y *Srebp-1c*, involucrados en procesos anabólicos; *Aco* y *Cyp4a1*, involucrados en la oxidación de lípidos, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en hígados de fetos hembra al día 21 de gestación provenientes del grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

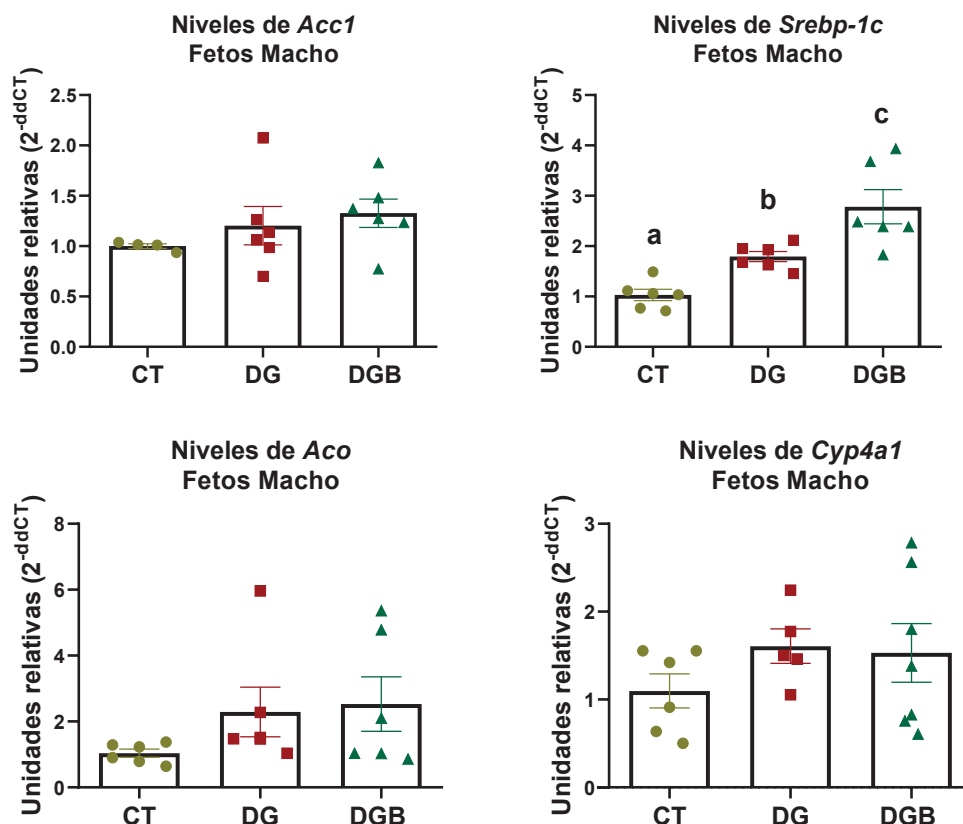


Figura 22. Genes involucrados en la síntesis y oxidación de lípidos en el hígado de feto macho en el día 21 de gestación. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de *Acc1* y *Srebp-1c*, involucrados en procesos anabólicos; *Aco* y *Cyp4a1*, involucrados en la oxidación de lípidos, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en hígados de feto macho al día 21 de gestación provenientes del grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

➤ Transporte e internalización de lípidos.

Analizamos los niveles de dos genes involucrados en el transporte e internalización de lípidos, *Cd36* y *Lpl*. En los hígados de los fetos al día 21 de gestación no observamos diferencias significativas en los niveles de ARN mensajero de *Cd36* ni *Lpl* entre los grupos en estudio, en ambos sexos (Fig. 23A y 23B).

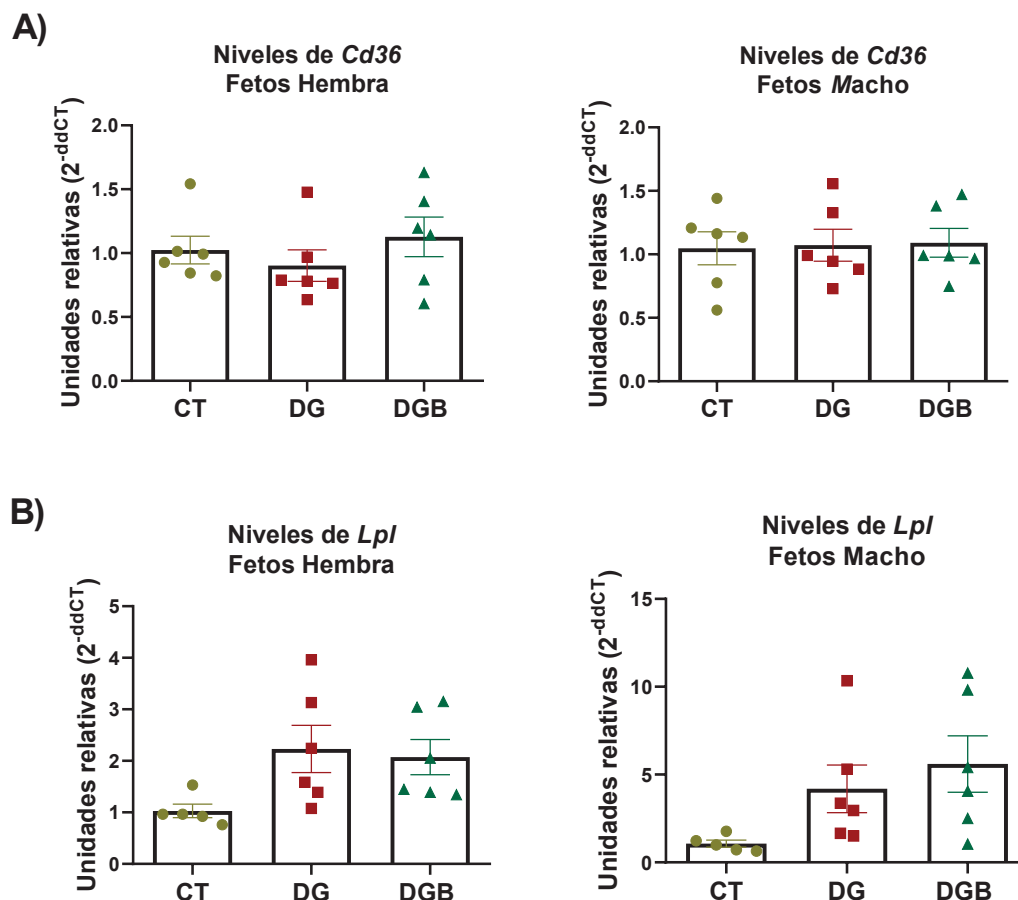


Figura 23. Genes involucrados en el transporte e internalización de lípidos en el hígado fetal en el día 21 de gestación. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de: A) *Cd36* y B) *Lpl*, involucrados en el transporte e internalización de lípidos, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en hígados de fetos hembra y macho al día 21 de gestación provenientes grupo de ratas control (CT, n=8), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, n=7) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, n=7). Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

➤ Respuesta antioxidante y de biotransformación al exceso de lípidos.

Analizamos los niveles de *Sod2*, enzima de la matriz mitocondrial que elimina los radicales de oxígeno producidos por las numerosas reacciones de oxidación-reducción y de transporte de electrones que tienen lugar en las mitocondrias, y de *Ahr*, un factor de transcripción que detecta toxinas ambientales, dietarias y ligandos endógenos, induciendo así enzimas de biotransformación y modulando la diferenciación y las respuestas de las células inmunitarias. Vimos que en los hígados fetales hembra al día 21 de gestación

había un incremento de los niveles de ARN mensajero de *Sod2* en el grupo DG (CT vs DG, $p < 0,05$), que se previno en el grupo DGB (DG vs DGB, $p < 0,05$) (**Fig. 24A**), mientras que en los hígados de fetos macho no hubo diferencias significativas entre los grupos. Además, los niveles de ARN mensajero de *Ahr* no mostraron diferencias significativas entre los grupos en estudio en hembras ni en machos (**Fig. 24B**).

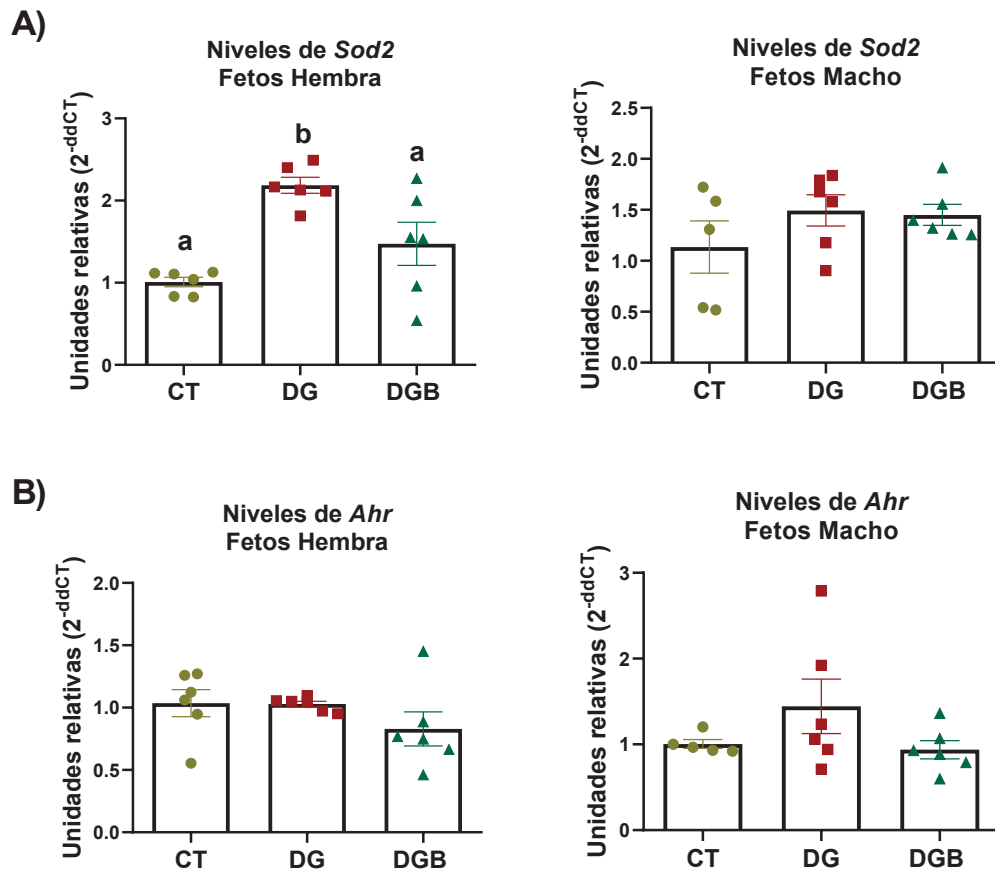


Figura 24. Genes involucrados en la respuesta antioxidante y de biotransformación al exceso de lípidos en el hígado fetal en el día 21 de gestación. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de: A) *Sod2*, involucrado en la respuesta antioxidante, y B) *Ahr*, involucrado en la respuesta de desintoxicación, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en hígados de fetos hembra y macho al día 21 de gestación provenientes del grupo de ratas control (CT, $n=8$), del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (DG, $n=7$) y del grupo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato (DGB, $n=7$). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

Conclusiones capítulo 4:

El ambiente obesogénico materno influye en el feto en desarrollo, programando alteraciones metabólicas en los mismos. En nuestro estudio, observamos que el sobrepeso materno inducido por una dieta rica en grasas saturadas condujo a una disminución de la trigliceridemia fetal en ambos sexos y una sobreacumulación de lípidos en los hígados fetales. La disminución en la trigliceridemia probablemente se deba a que, a pesar de haber mayores niveles de triglicéridos en la circulación de las madres DG, la placenta y el hígado fetal presentaron una sobreacumulación excesiva de triglicéridos. También observamos un incremento de los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c* en los hígados de los fetos DG de ambos sexos, probablemente asociado a la acumulación de lípidos en los hígados fetales. En los hígados de los fetos hembra del grupo DG también vimos un incremento de *Cyp4a1* y *Sod2*, probablemente para hacer frente a la gran afluencia de lípidos y especies reactivas del oxígeno. Además, observamos un incremento en la actividad de la enzima hepática ALT fetal, que junto con las alteraciones encontradas en el hígado fetal evidencia un daño hepático, característico de la EHGNA.

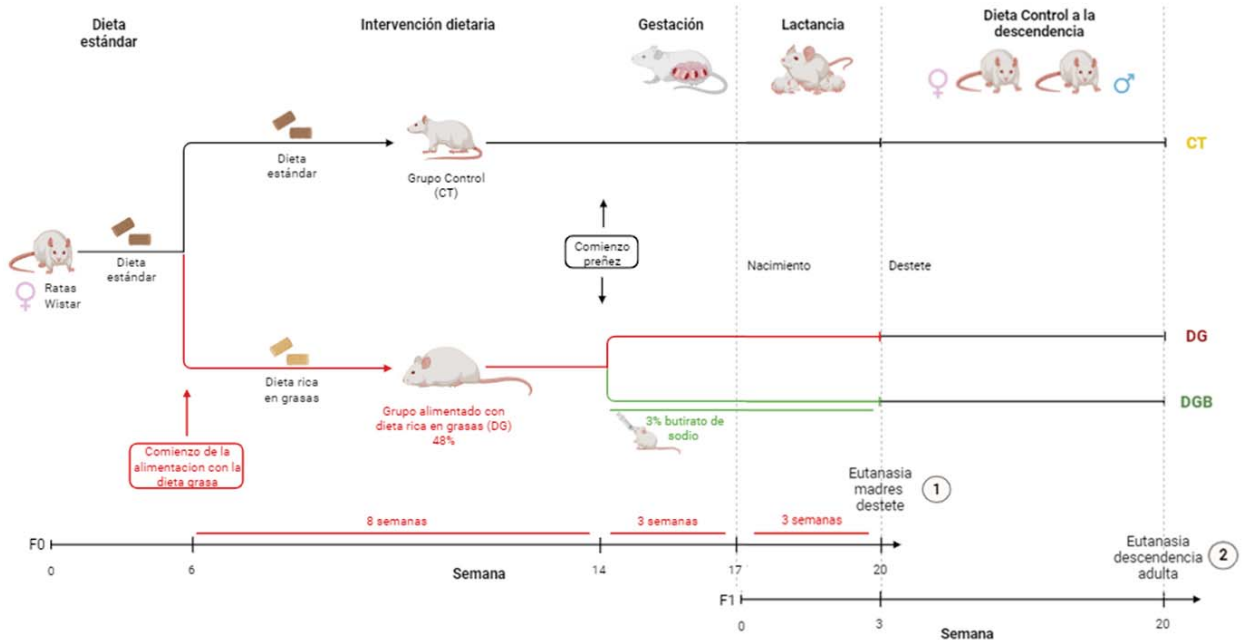
El tratamiento materno con butirato previno la sobreacumulación de lípidos en los hígados de los fetos en ambos sexos en el grupo DGB. Además, previno el incremento de los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c*, *Cyp4a1* y *Sod2* en los hígados de los fetos hembra DGB, junto con una prevención de la actividad de la ALT, evidenciando una mejora en el programa metabólico de la descendencia de madre con sobrepeso. En los fetos macho, a pesar de acentuar el incremento en los niveles de ARN mensajero de *Srebp1c*, sí previno el incremento en la acumulación lipídica y normalizó la actividad de la transaminasa ALT fetal, lo que indicaría que el tratamiento materno con butirato mejora el programa metabólico de la descendencia de madre con sobrepeso por vías diferentes dependiendo del sexo.

Dado estos resultados, es de nuestro interés evaluar si la prevención de estas anomalías persiste en la descendencia cuando llegan a su adultez.

PARTE B: Modelo de programación

La lactancia, al igual que la gestación y la primera infancia, son momentos cruciales para el desarrollo de la descendencia en crecimiento y por ello es que un desafío nutricional durante los mismos influye en la salud de la descendencia a lo largo de toda su vida (Picó et al., 2021).

Con el objetivo de evaluar el efecto de la dieta rica en grasas saturadas y el tratamiento materno con butirato sobre el desarrollo y crecimiento de la descendencia en su adultez, se decidió seguir el modelo explicado en el capítulo 1 hasta la vida adulta de la descendencia. Para esto, se dejaron nacer a las crías y durante la lactancia se continuó alimentando a las madres con sus respectivas dietas. El tratamiento oral con butirato de sodio se administró durante la lactancia 3 veces por semana en una concentración de 1%. Como ya se mencionó, la reducción de dosis y frecuencia se debe a la disminución del peso post parto que no guarda relación con la ingesta y a la protección del cuidado de las crías. De acuerdo a la ausencia de efectos del butirato sobre los fetos CT, se administró el AGCC solo a las ratas del grupo DG, que habían recibido butirato durante la gestación. Los grupos que no fueron tratados con butirato se les administró vehículo con la misma frecuencia y volumen. La camada se ajustó a 8 crías. Luego del destete, las crías de todos los grupos experimentales fueron alimentadas con alimento control. A las madres se les practicó la eutanasia al destete y a la descendencia, a los 140 días de edad (**Esquema 11**). En esta sección de la tesis contamos con 3 grupos experimentales. El **grupo CT** se conformó de la siguiente manera: ratas al destete alimentadas con dieta estándar durante toda su vida y su descendencia de 140 días de edad. El **grupo DG** se conformó de la siguiente manera: ratas al destete alimentadas con dieta rica en grasas saturadas 8 semanas previas a la gestación y durante la gestación y la lactancia, y su descendencia de 140 días de edad. El **grupo DGB** se conformó de la siguiente manera: ratas al destete alimentadas con dieta rica en grasas saturadas 8 semanas previas a la gestación y durante la gestación y la lactancia, y tratadas con butirato durante toda la gestación y lactancia, y su descendencia de 140 días de edad (**Esquema 11**).



Esquema 11: Modelo experimental de sobrepeso materno para la obtención de suero y tejidos maternos al destete, y plasma y órganos de la descendencia a los 140 días de edad. **CT:** ratas progenitoras alimentadas con dieta estándar y su descendencia alimentada con dieta estándar a partir del destete, **DG:** ratas progenitoras alimentadas con dieta rica en grasas y su descendencia alimentada con dieta estándar a partir del destete y **DGB:** ratas alimentadas con dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia, y su descendencia alimentada con dieta estándar a partir del destete. El 1 en el esquema representa el momento en el cual se realiza la eutanasia de las madres al destete, y el 2 representa el momento en el cual se realiza la eutanasia de la descendencia a los 140 días de edad.

CAPÍTULO 5: Efecto del sobrepeso materno por una dieta rica en grasas saturadas. Tratamiento con butirato durante la preñez y la lactancia. Caracterización de las madres al destete.

Parámetros maternos al destete.

Luego de finalizar la lactancia, a las madres se les practicó la eutanasia con el objetivo de evaluar el efecto del sobrepeso materno inducido por una dieta rica en grasas saturadas luego de la gestación y la lactancia sobre su peso, sus tejidos y sus parámetros séricos, y cómo el tratamiento con butirato influyó en ellas.

En relación a los parámetros maternos al destete, observamos que las madres no presentaban diferencia en el peso corporal (**Tabla 8**). Las madres del grupo DG presentaron un menor índice hepático y un mayor peso relativo del tejido adiposo (CT vs DG, $p<0,05$), mientras que las madres DGB no presentaban diferencias contra el grupo CT (**Tabla 8**). No encontramos diferencias significativas en la longitud corporal o en el peso relativo del corazón (**Tabla 8**).

MADRES DESTETE	CT	DG	DGB
Peso corporal materno (g)	322±5 a	347±19 a	328±8 a
Índice hepático materno (%)	3,64±0,04 a	3,19±0,17 b	3,56±0,10 a
Peso tejido adiposo materno relativo (%)	2,51±0,34 a	5,56±0,60 b	3,80±0,71 ab
Peso corazón materno relativo (%)	0,37±0,01 a	0,35±0,03 a	0,35±0,02 a
Longitud (cm)	22,20±0,33 a	22,13±0,47 a	21,5±0,20 a

Tabla 8. Parámetros maternos al destete. Peso corporal materno, índice hepático materno, peso del adiposo materno relativo al peso corporal, peso del corazón materno relativo y longitud de las madres al destete del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

Parámetros séricos maternos al destete.

En relación a los parámetros séricos maternos, observamos que no presentaban diferencias significativas en la glucemia y la colesterolemia entre los grupos (**Fig. 25A y B**), aunque sí observamos una disminución en la trigliceridemia en las madres al destete del grupo DGB (CT vs DGB, $p < 0,05$), mientras que las DG no presentaban diferencias contra ninguno de los otros dos grupos en estudio (**Fig. 25C**). Observamos un incremento en los niveles circulantes de IL-1 β en el grupo DG (CT vs DG, $p < 0,05$), que no se observa en el grupo DGB (DG vs DGB) (**Fig. 25D**). Además, observamos una correlación negativa entre el peso del tejido adiposo y la trigliceridemia materna al destete (**Fig. 25E**).

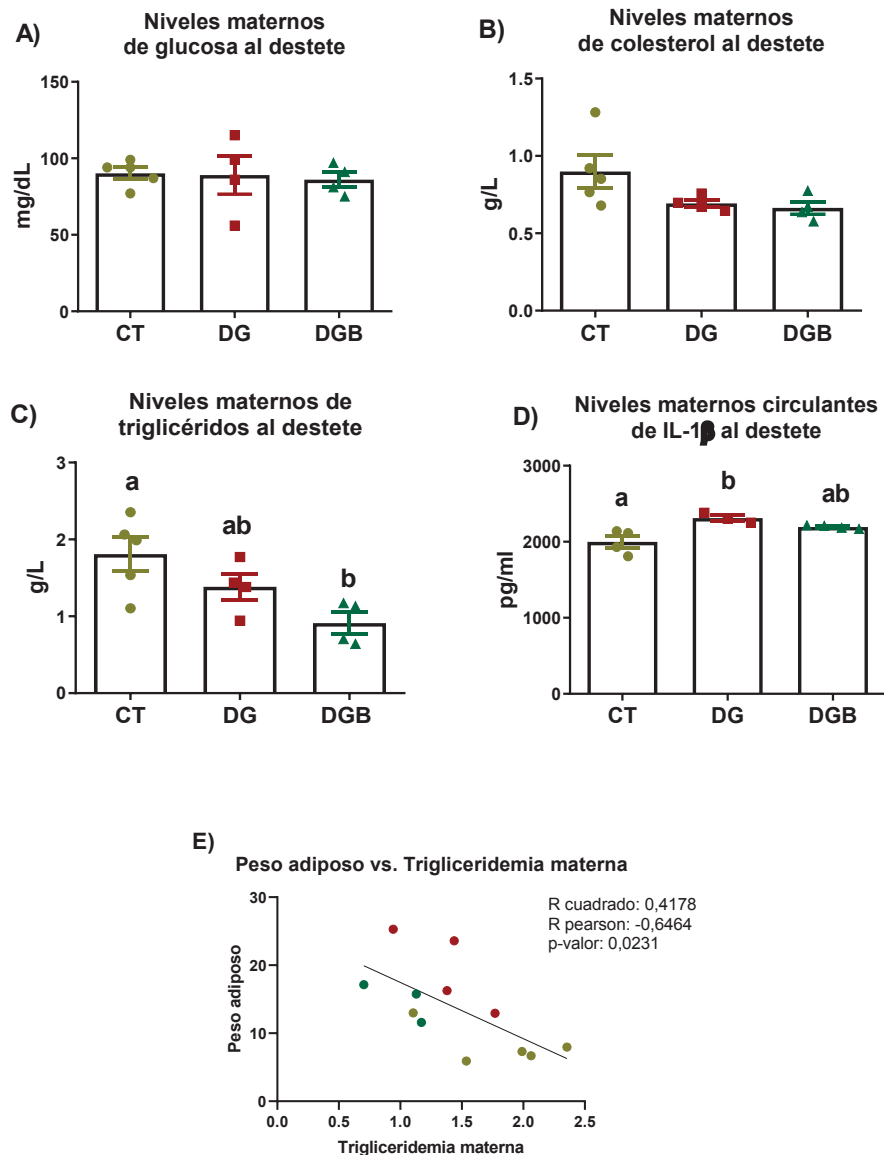


Figura 25. Parámetros séricos en la madre al destete. Niveles séricos de: A) glucosa, B) colesterol, C) triglicéridos y D) IL-1 β en madres al destete del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey. E) Correlación entre el peso del tejido adiposo y la trigliceridemia materna al destete.

En cuanto a la evaluación de la función hepática, en el suero de las madres al destete vimos que no había diferencias significativas en los niveles de albúmina ni de bilirrubina total entre los grupos (**Fig. 26A y B**). Además, observamos que el sobrepeso indujo un incremento de las actividades circulantes de ALT y ALP con respecto del CT

(CT vs DG, $p<0,05$), y que el tratamiento con butirato durante la preñez y la lactancia prevenía el incremento de ALT (DG vs DGB, $p<0,05$), no así de ALP (**Fig. 26C y D**). Además, evidenciamos que la actividad de la AST estaba disminuida en el grupo DGB con respecto al grupo DG (DG vs DGB, $p<0,05$) (**Fig. 26E**).

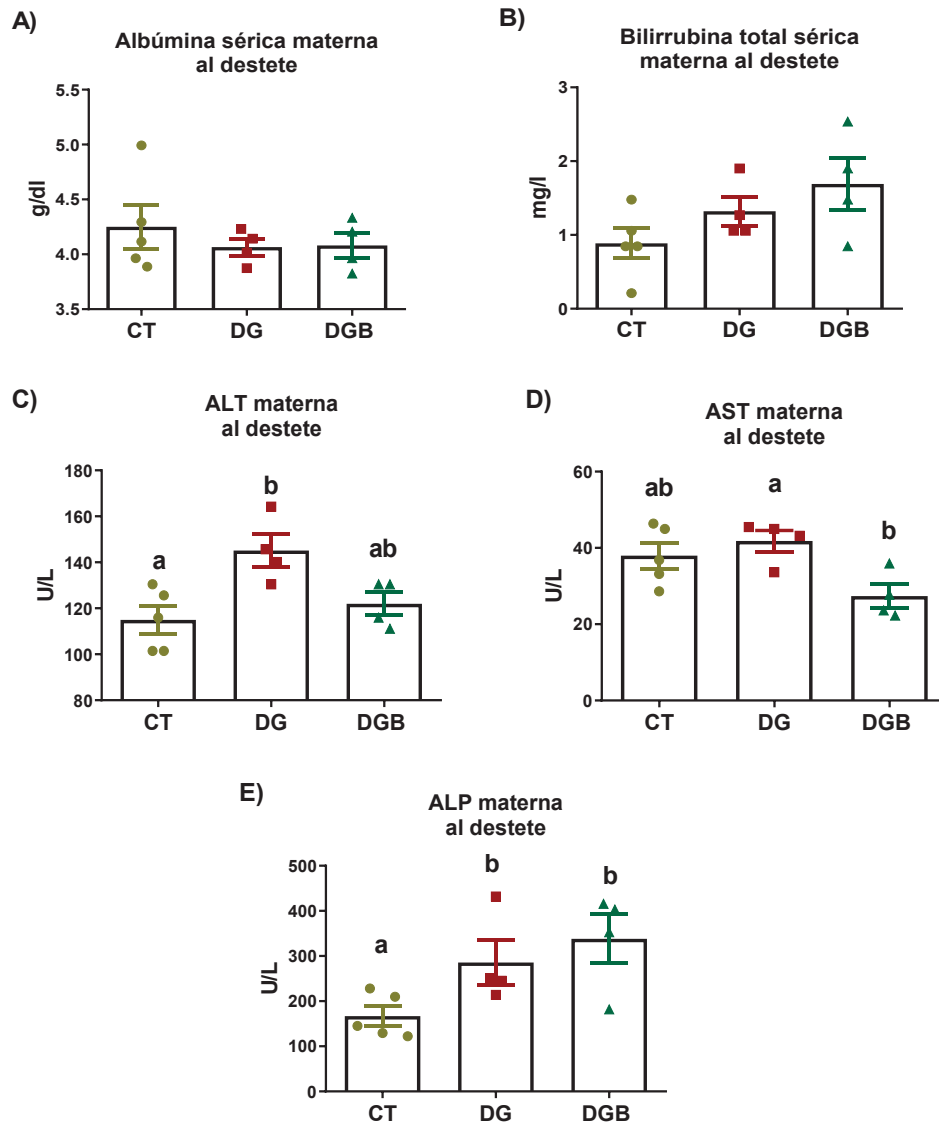


Figura 26. Función hepática materna al destete. A) Niveles séricos albúmina, B) niveles séricos de bilirrubina total, C) actividad de la alanina aminotransferasa (ALT), D) actividad de la aspartato aminotransferasa (AST) y E) actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en madres al destete del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

Efecto del sobrepeso materno y el tratamiento con butirato de sodio sobre la preñez y la lactancia en los hígados maternos al destete.

En nuestro estudio hicimos enfoque en las madres, no sólo para indagar cómo era el estado metabólico y cómo esto influiría en los fetos y las crías durante la vida temprana, sino también para dilucidar si este tratamiento con butirato resultaba beneficioso para la vida futura de la descendencia y cuál era el efecto en las madres.

Nos alertó que la administración de butirato, si bien lograba prevenir el incremento de la trigliceridemia, acentuara la acumulación lipídica en los hígados de las ratas progenitoras con sobrepeso al día 21 de preñez.

Por ello, al igual que se realizó con las madres al día 21 de gestación, evaluamos los hígados de las madres al destete para evaluar la condición hepática y la presencia de marcadores de la enfermedad de hígado graso.

Contenido lipídico en los hígados de madres al destete.

Analizamos mediante TLC las 5 especies lipídicas ya mencionadas, y observamos que el grupo DG presentaba una sobreacumulación de triglicéridos y de ésteres de colesterol (CT vs DG, $p < 0,05$), sin evidenciarse diferencias en colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos libres (**Fig. 27**). Esta sobreacumulación se mantuvo, pero no se acentuó, en el grupo DGB (CT vs DGB, $p < 0,05$) (**Fig. 27**), a diferencia de lo que ocurre en las gestantes a término. Además, tanto el contenido de triglicéridos como de ésteres de colesterol en el hígado materno al destete correlaciona negativamente con la trigliceridemia materna y positivamente con el peso del tejido adiposo materno al destete (**Fig. 28**, $p < 0,05$).

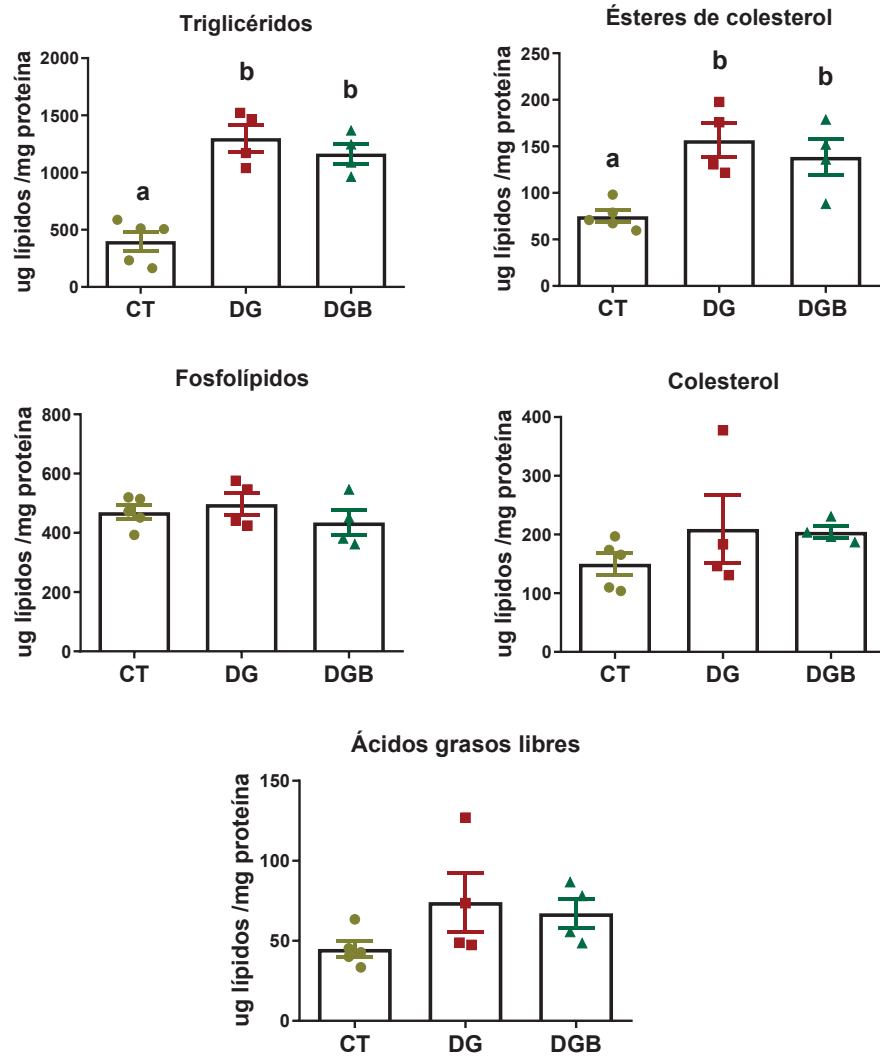


Figura 27. Contenido lipídico en el hígado materno al destete. Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en hígados de madres al destete del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

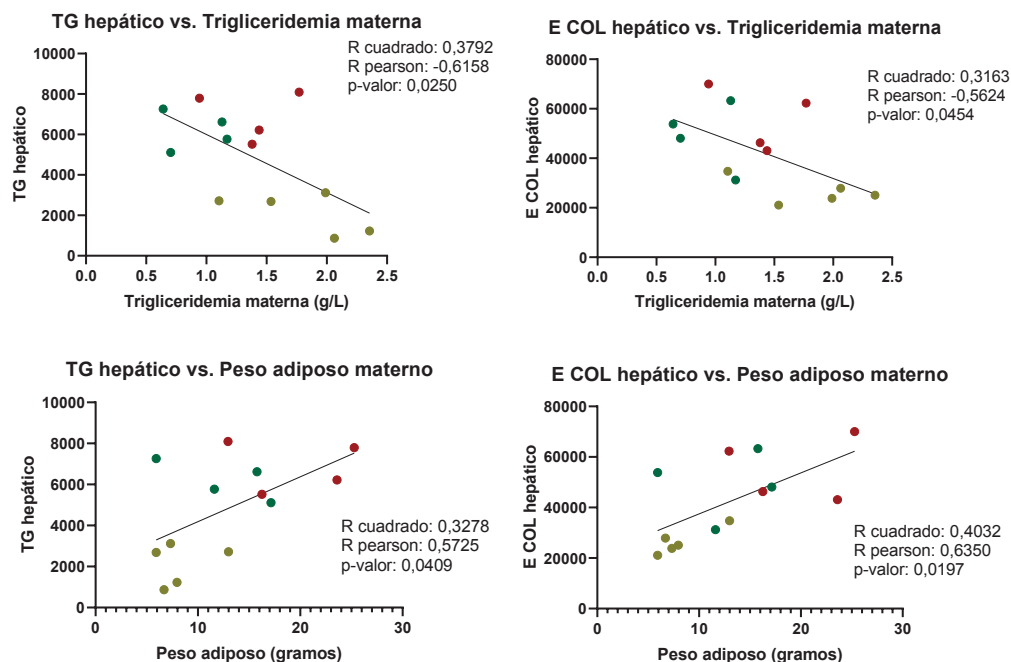


Figura 28: Contenido de lípidos hepáticos vs. trigliceridemia materna y peso del tejido adiposo materno. Prueba de correlación entre el contenido de triglicéridos y de ésteres de colesterol en el hígado materno al destete y la trigliceridemia materna y el peso del tejido adiposo materno al destete.

Niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo lipídico en los hígados maternos al destete.

Luego decidimos evaluar en el hígado materno al destete los niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y en la inflamación.

➤ Factores de transcripción involucrados en el metabolismo lipídico.

Se evaluaron los niveles de ARN mensajero del factor de transcripción *Srebp-1c*, involucrado en procesos anabólicos, y observamos un incremento en ambos grupos de dieta grasa, con y sin tratamiento con butirato (CT vs DG y CT vs DGB, $p < 0,05$) (**Fig. 29A**). Además, evaluamos otro factor de transcripción, *Lxra*, que regula genes implicados en la homeostasis lipídica y la inflamación, entre los cuales se encuentra *Srebp-1*. Los niveles de ARN mensajero de *Lxra* no presentaron diferencias significativas entre los grupos en estudio, con una tendencia a incrementar en el grupo DG ($p = 0,10$) (**Fig. 29B**).

Los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c* correlacionaron positivamente con el peso del tejido adiposo materno y negativamente con la trigliceridemia materna (Fig. 29C y 29D).

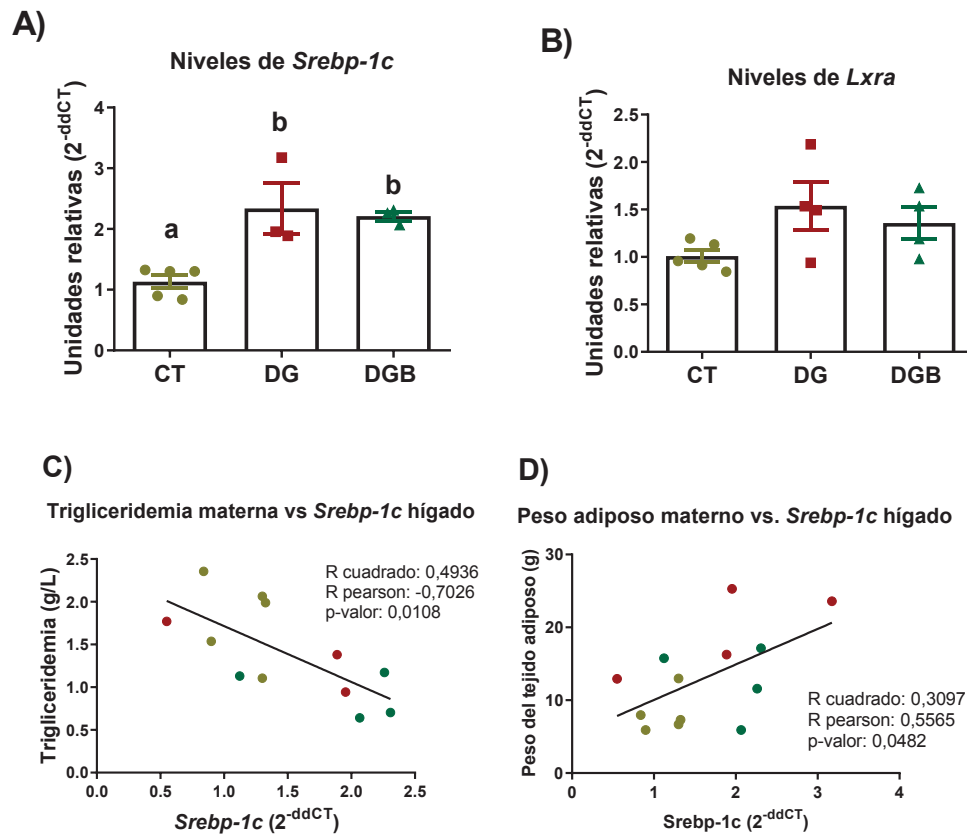


Figura 29. Factores de transcripción involucrados en el metabolismo lipídico en el hígado materno al destete. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de los factores de transcripción: A) *Srebp-1c* y B) *Lxra*, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en hígados de madres al destete del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4); y las correlaciones entre los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c* y: C) trigliceridemia materna y D) peso del tejido adiposo materno. Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey, y Correlación.

➤ Síntesis de lípidos.

En relación a la síntesis de lípidos, evaluamos los niveles de ARN mensajero de *Acc1* y *Fasn*, enzimas lipogénicas, y observamos que estaban deprimidos en los grupos DG y DGB (CT vs DG y CT vs DGB, $p < 0,05$) (**Fig. 30**), de manera similar a lo observado en los hígados de las madres al día 21 de gestación presentado en el capítulo 2 de la presente tesis.

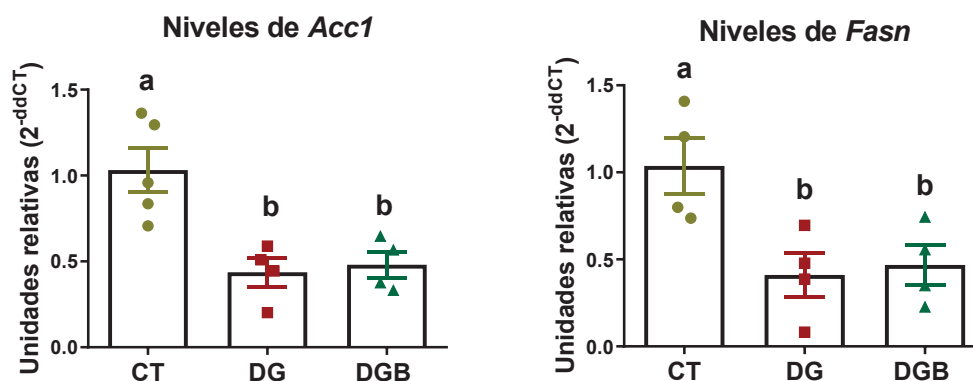


Figura 30. Genes involucrados en la síntesis de lípidos en el hígado materno al destete. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de: A) *Acc1* y B) *Fasn*, involucrados en la síntesis de lípidos, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en hígados de madres al destete del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

➤ Transporte interno de lípidos.

En relación al transporte intracelular de ácidos grasos, observamos que los niveles de ARN mensajero de *Fabp5* se encontraban disminuidos en ambos grupos de dieta grasa (CT vs DG y CT vs DGB, $p < 0,05$) (**Fig. 31**).

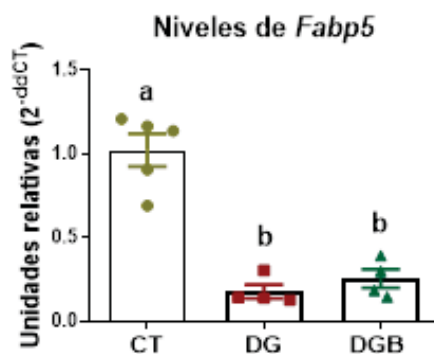


Figura 31: Genes involucrados en el transporte interno de lípidos en el hígado materno al destete. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de *Fabp5*, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en hígados de madres al destete del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

➤ Oxidación de lípidos.

Se evaluaron distintos genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos. No observamos diferencias significativas en los niveles de ARN mensajero de *Cyp4a1*, involucrado en la ω -hidroxilación, en *Aco*, enzima que cataliza la β -oxidación peroxisomal de ácidos grasos, ni en *Hadha*, enzima que cataliza la β -oxidación mitocondrial (**Fig. 32A, B y C**). De manera diferente, encontramos que el sobrepeso indujo un incremento en los niveles de ARN mensajero de *Acaa2* (CT vs DG, $p<0,05$) y que con el tratamiento con butirato se mantuvo el incremento (DG vs DGB) (**Fig. 32D**).

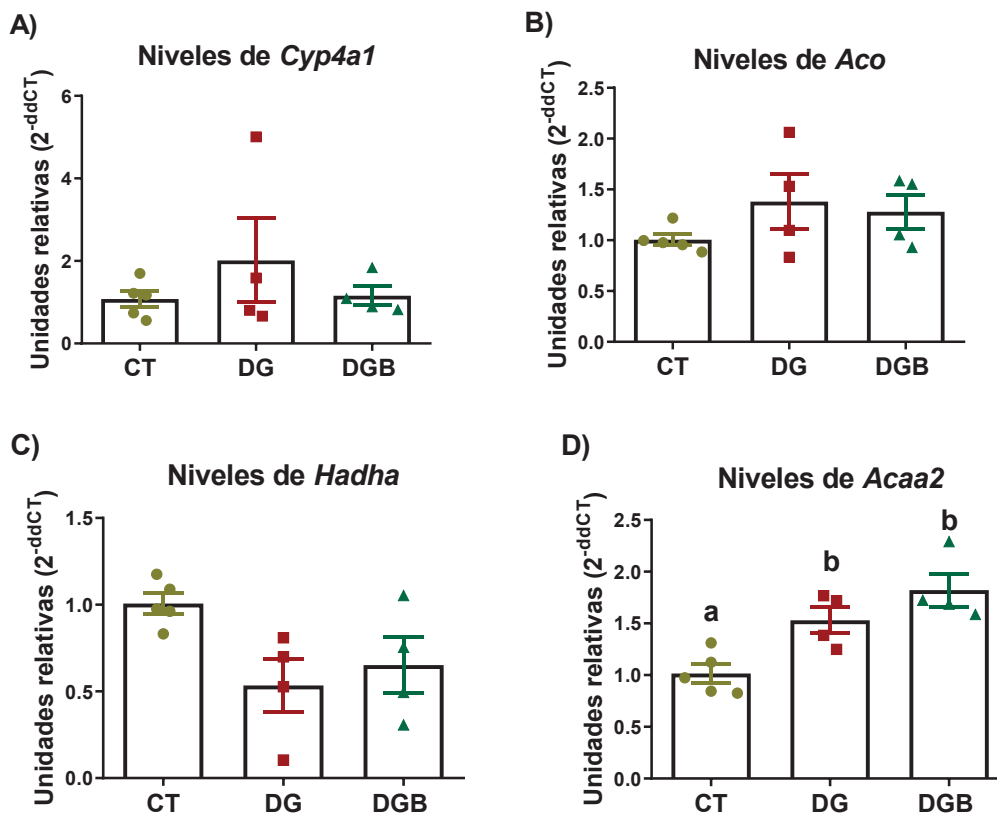


Figura 32. Genes involucrados en la oxidación de lípidos en el hígado materno al destete. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de: A) *Cyp4a1*, B) *Aco*, C) *Hadha* y D) *Acaa2*, involucrados en la oxidación de lípidos, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en hígados de madres al destete del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

➤ Inflamación.

Dado que tanto el sobrepeso como la obesidad están relacionados con un estado proinflamatorio crónico, evaluamos en el hígado de las madres al destete los niveles de ARN mensajero de *Nlrp3* e *Il-18*. El inflammasoma NLRP3 es un miembro de la familia de los receptores tipo Nod de sensores de células inmunitarias innata, que está implicado en la activación de la caspasa-1 y la subsiguiente secreción de IL-1 β e IL-18. No observamos diferencias significativas en los niveles de ARN mensajero de *Nlrp3* ni de *Il-18* entre los grupos en estudio (**Fig. 33**).

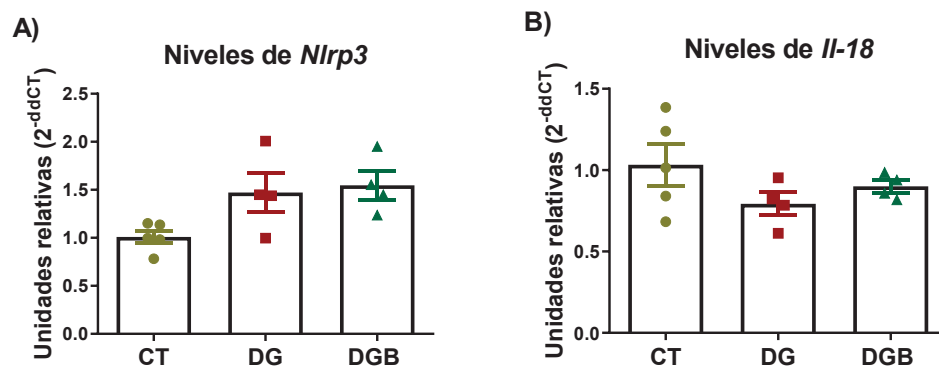


Figura 33. Genes involucrados en la inflamación en el hígado materno al destete. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de: A) *Nlrp3* y B) *Il-18*, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en hígados de madres al destete del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

Lipoperoxidación tisular en los hígados de madres al destete.

Una excesiva lipoperoxidación representa un indicador importante de daño tisular, dado por el daño oxidativo a los lípidos mediado por especies reactivas del oxígeno (ROS). En el hígado materno al destete, observamos un incremento en la lipoperoxidación en los hígados de rata con sobrepeso (CT vs DG, $p < 0,05$), que no se observa en el grupo DGB (DG vs DGB) (**Fig. 34**).

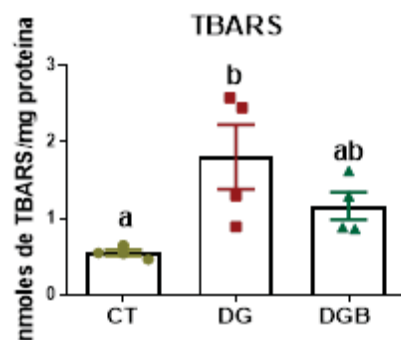


Figura 34. Lipoperoxidación tisular en los hígados de madres al destete. Lipoperoxidación tisular medido como la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) evaluado en los hígados de madres al destete del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Kruskal-Wallis, post test Dunn.

Conclusión Capítulo 5:

En el presente capítulo evaluamos el estado de las madres al destete de los distintos grupos es estudio. Las madres DG no presentaron diferencias de peso al momento de la eutanasia, pero si un incremento del peso del tejido adiposo relativo. Además, el sobrepeso materno por la dieta rica en grasas saturadas condujo a un incremento en la actividad circulante de ALT y ALP, sobreacumulación de lípidos en el hígado y un incremento en la lipoperoxidación hepática, todos parámetros característicos del hígado graso.

El tratamiento con butirato de sodio durante la gestación y lactancia previno el incremento en el peso relativo del tejido adiposo, el incremento en la actividad ALT, la lipoperoxidación hepática y redujo la actividad AST y la trigliceridemia, manteniéndose elevada la actividad ALP y la acumulación de lípidos en el hígado. Esta atenuación de algunas alteraciones muestra un mejor panorama que el que observamos en el capítulo 2 de las madres a término, que no mostraba cambios en el porcentaje de tejido adiposo y presentaban una acumulación de lípidos hepática aún mayor que el grupo con sobrepeso y sin tratamiento.

En cuanto a los niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo lipídico, vimos una respuesta similar en ambos grupos, DG y DGB. En ambos grupos observamos un incremento de los niveles de *Srebp1c*. Además, vimos una depresión de las enzimas de síntesis, *Fasn* y *Acc1*, lo que probablemente se deba al exceso de lípidos acumulados que se observa en los hígados de ambos grupos. Observamos diferencias en las enzimas de la β -oxidación, evidenciando un incremento en los niveles de ARN mensajero de *Acaa2*. Es por ello que podemos inferir que, si bien el tratamiento con butirato atenúa algunas alteraciones maternas y acentúa otras durante la gestación, al final de la lactancia resulta aparentemente beneficioso, o al menos no perjudicial, para las madres con sobrepeso. En el próximo capítulo analizaremos el efecto de la administración materna de butirato sobre la descendencia de rata con sobrepeso.

CAPÍTULO 6: Efecto del sobrepeso materno y del tratamiento con butirato durante la gestación y la lactancia en la descendencia de 140 días de edad. Caracterización, parámetros metabólicos, hepáticos y reproductivos.

El sobrepeso y la obesidad programan alteraciones metabólicas en la descendencia que predisponen a desarrollar alteraciones metabólicas en su vida adulta (Fernandez-Twinn et al., 2019). En trabajos realizados en nuestro laboratorio se ha evidenciado que la descendencia de madres con sobrepeso, a pesar de no mostrar sobrepeso o alteraciones en los lípidos circulantes, desarrollan EHGNA y las alteraciones a nivel intestinal que acompañan a esa patología (Heinecke et al., 2024, 2020).

Con el objetivo de evaluar el efecto del sobrepeso materno en la descendencia y si el tratamiento materno con butirato durante la gestación y lactancia fue capaz de prevenir el desarrollo de las alteraciones características de hígado graso en la descendencia, se estudió la descendencia a los 140 días de edad.

Se registró el peso corporal y al momento del destete, observamos que la descendencia del grupo DG no presentó diferencias significativas con respecto al CT (CT vs DG), aunque la descendencia del grupo DGB sí presentó un menor peso corporal comparado contra el grupo CT (CT vs DGB, $p<0,05$) (**Tabla 9**). Luego del destete, la descendencia se alimentó con dieta estándar y se les practicó la eutanasia a los 140 días de edad. Al día de la eutanasia, la descendencia del grupo DG no presentó diferencias en el peso corporal comparado con el CT (CT vs DG) (**Tabla 9**). En el grupo DGB, los machos presentaron una disminución en su peso comparado con el grupo CT y DG (CT vs DGB y DG vs DGB, $p<0,05$), mientras que las hembras no presentaron diferencias (**Tabla 9**). No observamos diferencias en el índice hepático entre los grupos en estudio. El índice de tejido adiposo, que en hembras DG parece tener una tendencia a incrementar, disminuye a valores por debajo del control por el tratamiento materno con butirato (DG vs DGB, $p<0,05$) (**Tabla 9**). Por otro lado, en los machos, a pesar de no observarse efectos del sobrepeso materno sobre el porcentaje del tejido adiposo, el tratamiento materno con butirato produjo una disminución de dicho porcentaje (DG vs DGB, $p<0,05$) (**Tabla 9**). Estos cambios están relacionados, no con la longitud de la descendencia, en la que no vimos variaciones, sino con su contorno, ya que se observa disminuido en machos y en hembras por el tratamiento materno con butirato (CT vs DGB y DG vs DGB, $p<0,05$).

(**Tabla 9**). Esto se observa claramente en la correlación positiva entre el peso del tejido adiposo y el contorno, tanto en hembras como en machos (**Fig. 35**).

DESCENDENCIA 140 días		CT	DG	DGB
Peso corporal crías 21 días (g)	HEMBRA	54,4±1,6 a	51,9±3,6 ab	42,6±2,1 b
	MACHO	57,5±2,0 a	53,91±4,7 ab	44,21±2,0 b
Peso corporal descendencia 140 días (g)	HEMBRA	353,8±10,7 a	343,5±12,0 a	316,5±10,8 a
	MACHO	591,6±13,2 a	556,8±15,4 a	501,2±13,6 b
Índice hepático (%)	HEMBRA	3,1±0,09 a	3,1±0,08 a	3,2±0,12 a
	MACHO	3,0±0,02 a	3,0±0,12 a	2,8±0,07 a
Peso tejido adiposo absoluto (g)	HEMBRA	11,3±1,55 ab	13,1±0,89 a	9,1±0,67 b
	MACHO	17,8±1,92 a	17,1±2,17 a	10,3±1,08 b
Peso tejido adiposo relativo (%)	HEMBRA	3,2±0,34 ab	3,8±0,18 a	2,9±0,18 b
	MACHO	2,9±0,29 a	3,0±0,30 a	2,0±0,15 b
Longitud (cm)	HEMBRA	22,6±0,33 a	22,4±0,20 a	21,7±0,25 a
	MACHO	26,6±0,29 a	26,5±0,34 a	26,0±0,21 a
Contorno (cm)	HEMBRA	19,7±0,37 ab	20,3±0,21 a	18,8±0,14 b
	MACHO	24,2±0,37 a	23,97±0,53 a	22,0±0,60 b

Tabla 9. Parámetros de la descendencia a los 140 días de edad. Peso corporal al destete (21 días de edad) y al momento de la eutanasia (140 días de edad), índice hepático, peso del tejido adiposo relativo al peso corporal, longitud y contorno de la descendencia de 140 días de edad provenientes del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

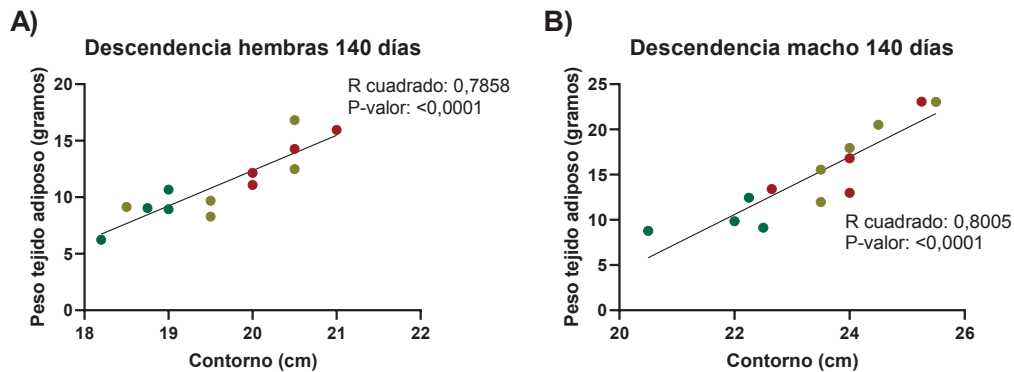


Figura 35. Contorno vs. Peso del tejido adiposo en la descendencia de 140 días de edad. Prueba de correlación entre el peso del tejido adiposo y el contorno de A) descendencia hembra y B) descendencia macho a los 140 días de edad provenientes del grupo de ratas control (CT), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB).

Parámetros plasmáticos en la descendencia a los 140 días de edad.

Se evaluaron los niveles de lípidos circulantes en la descendencia de 140 días de edad de los distintos grupos en estudio y no se encontraron diferencias significativas (**Fig. 36**).

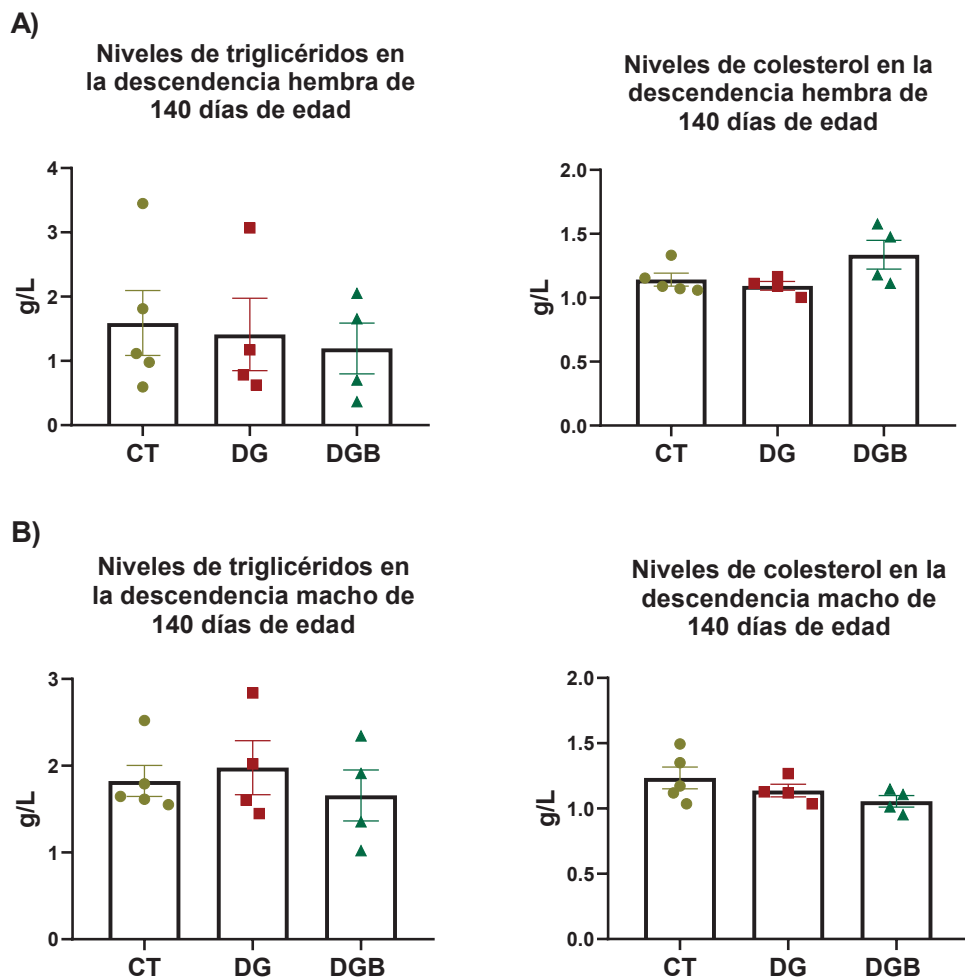


Figura 36. Parámetros plasmáticos de la descendencia a los 140 días de edad. Niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol en la descendencia A) hembra y B) macho a los 140 días de edad provenientes del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

Se dosó la actividad plasmática circulante de distintas enzimas hepáticas y de bilirrubina total en la descendencia de 140 días de edad para evaluar si presentaban daño hepático evidente a nivel sistémico. Observamos que no había diferencias en los niveles de bilirrubina o en la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) entre los grupos en estudio (**Fig. 37 y 38**). En la descendencia hembra, no observamos cambios en la actividad de la ALT, aunque sí observamos que el sobrepeso materno indujo un incremento en la actividad AST (CT vs DG, $p < 0,05$) que no fue prevenido por el tratamiento con materno

butirato (DG vs DGB) (**Fig. 37**). Mientras que, en la descendencia macho, observamos un incremento en la actividad de ambas transaminasas, ALT y AST, debido al sobrepeso materno (CT vs DG, $p<0,05$), y en este caso el tratamiento materno con butirato si fue capaz de prevenir ese incremento (DG vs DGB, $p<0,05$) (**Fig. 38**).

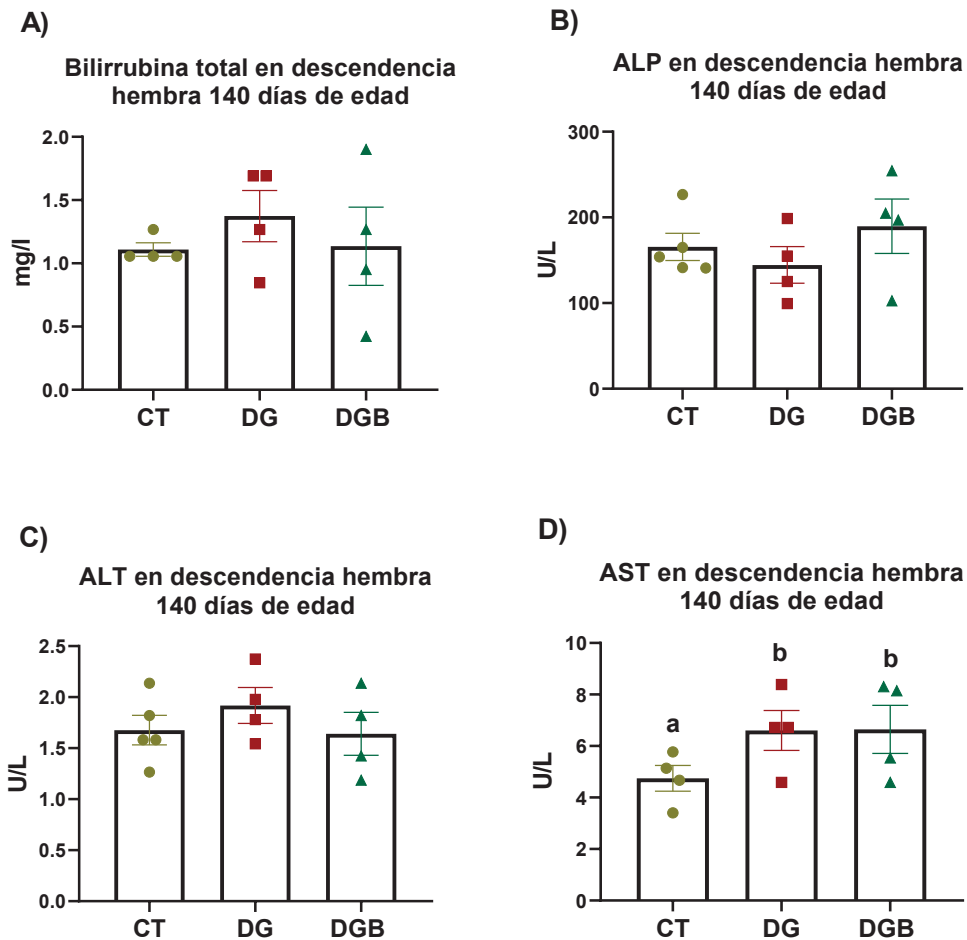


Figura 37. Función hepática de la descendencia hembra a los 140 días de edad. A) Niveles plasmáticos de bilirrubina total, B) actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), C) actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) y D) actividad de la aspartato aminotransferasa (AST) en el plasma de la descendencia hembra a los 140 días de edad provenientes del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

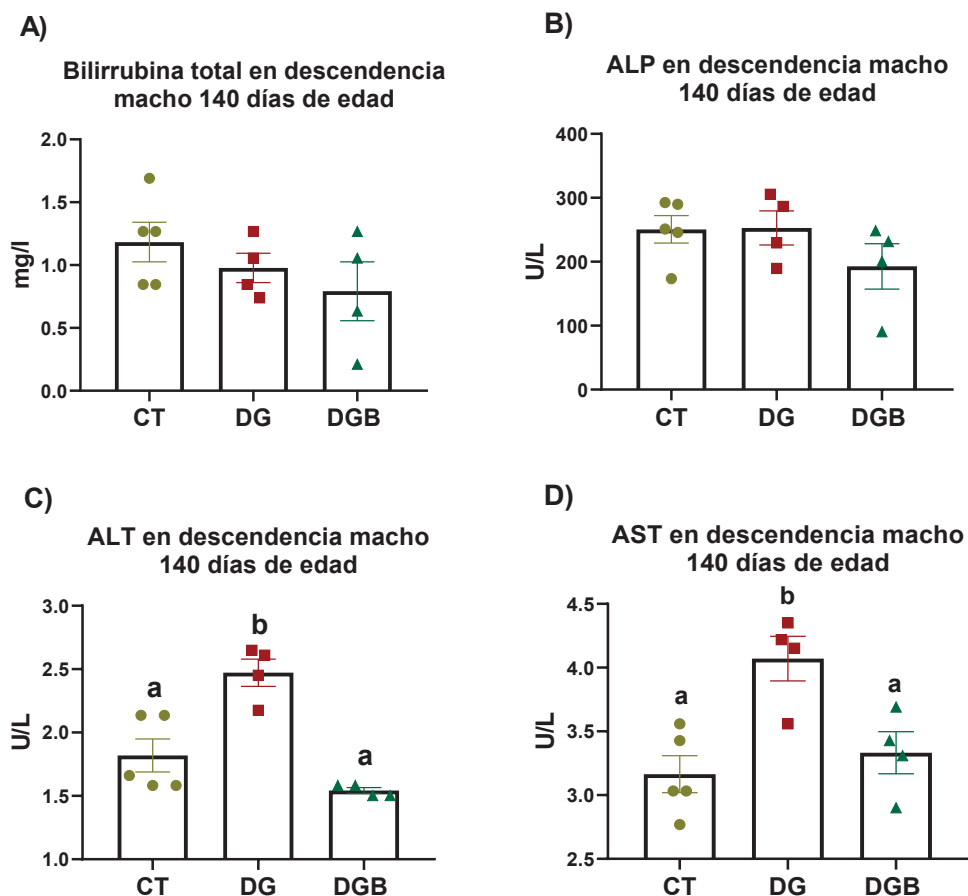


Figura 38. Función hepática de la descendencia macho a los 140 días de edad. A) Niveles plasmáticos de bilirrubina total, B) actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), C) actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) y D) actividad de la aspartato aminotransferasa (AST) en el plasma de la descendencia macho a los 140 días de edad provenientes del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

Contenido lipídico en los hígados de la descendencia de 140 días de edad.

Mediante TLC evaluamos los niveles de las 5 especies lipídicas, fosfolípidos, colesterol, ácidos grasos libres, triglicéridos y ésteres de colesterol, como previamente. Observamos una sobreacumulación de triglicéridos en los hígados de la descendencia hembra y macho, y una disminución de los ácidos grasos libres en la descendencia hembra del grupo DG (CT vs DG $p < 0,05$) (Fig. 39 y 40). El tratamiento materno con butirato

logró prevenir esta sobreacumulación de triglicéridos en la descendencia de ambos sexos y normalizó los niveles de ácidos grasos libres en las hembra (DG vs DGB $p < 0,05$) (**Fig. 39 y 40**). El resto de las especies lipídicas no mostraron cambios significativos entre los grupos en estudio.

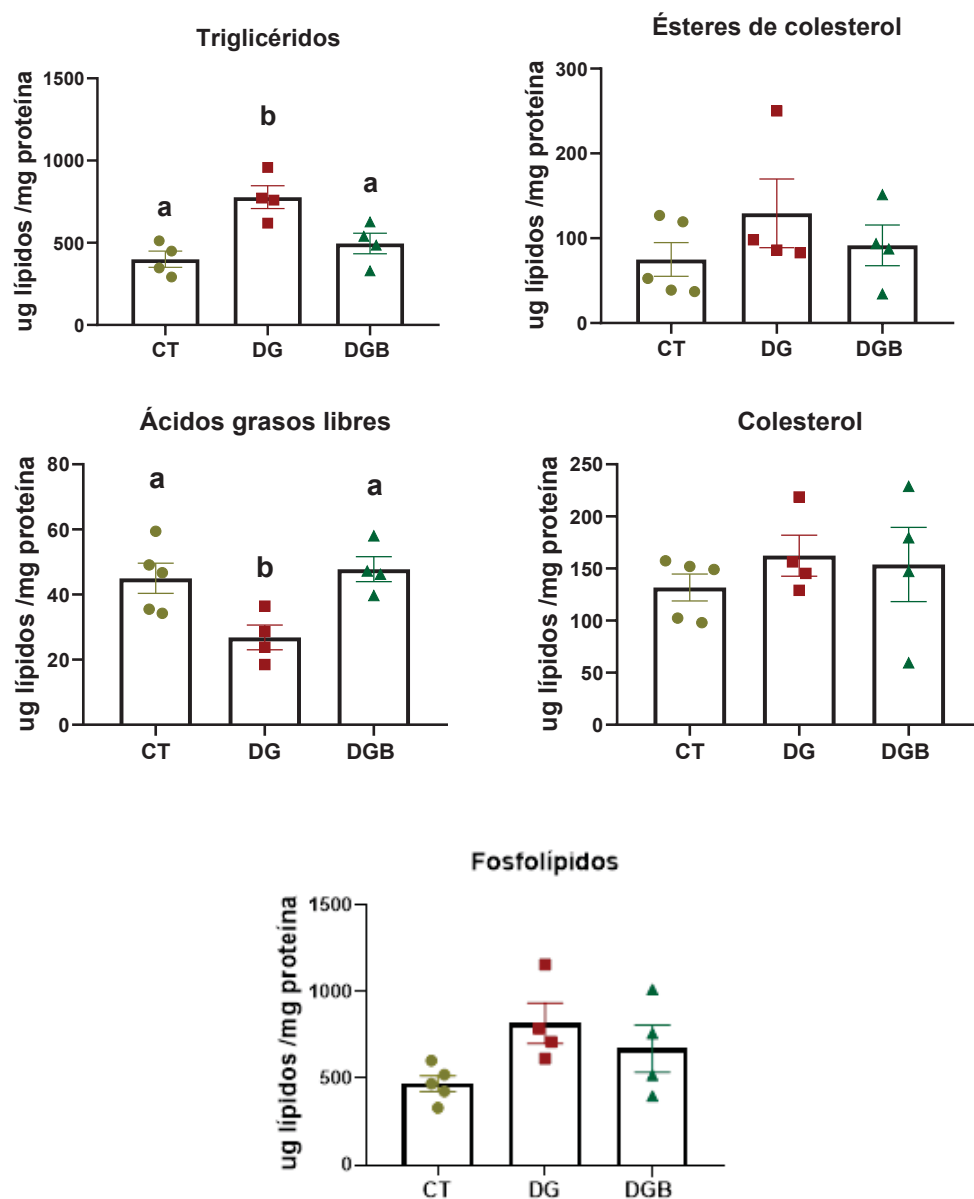


Figura 39. Contenido lipídico en los hígados de la descendencia hembra a los 140 días de edad. Niveles de lípidos (cromatografía en capa delgada, TLC) en hígado de la descendencia hembra a los 140 días de edad provenientes del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

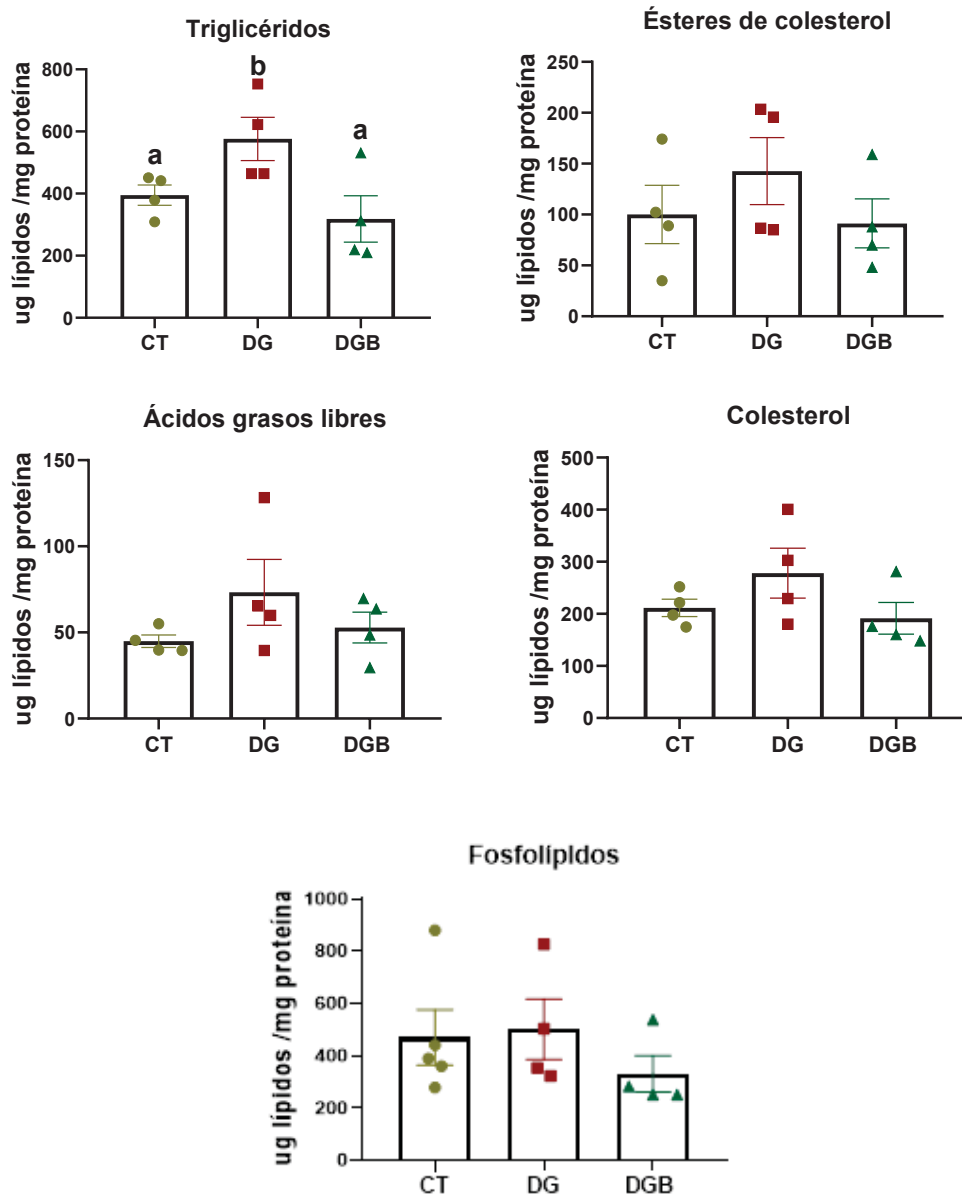
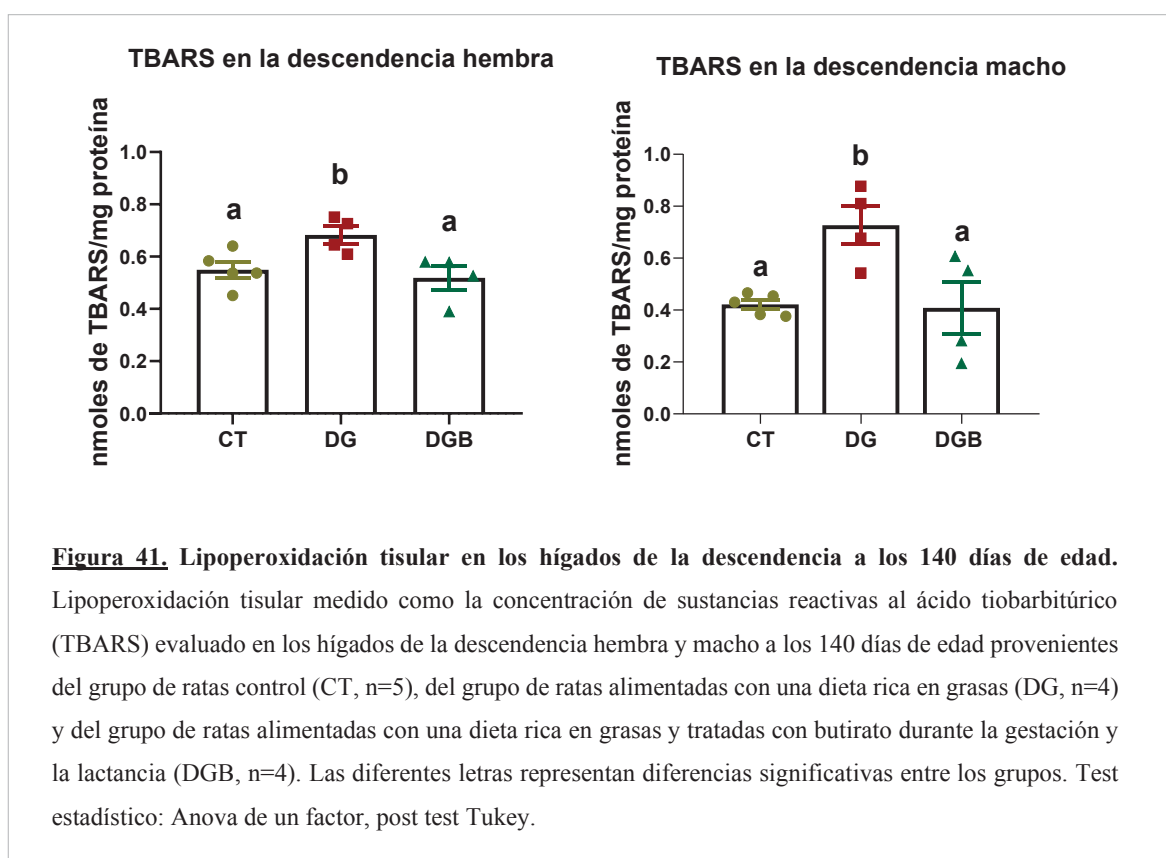


Figura 40. Contenido lipídico en los hígados de la descendencia macho a los 140 días de edad. Contenido lipídico (cromatografía en capa delgada, TLC) en hígado de la descendencia macho a los 140 días de edad provenientes del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

Lipoperoxidación tisular en los hígados de la descendencia de 140 días de edad.

Una excesiva lipoperoxidación representa un indicador importante de daño tisular, dado por el daño oxidativo a los lípidos mediado por especies reactivas del oxígeno (ROS). En el hígado de la descendencia a los 140 días de edad evaluamos la lipoperoxidación mediante TBARS y observamos un incremento de sus niveles en el grupo DG tanto en la descendencia hembra como macho (CT vs DG, $p < 0,05$), alteración que se previno con el tratamiento materno con butirato (DG vs DGB, $p < 0,05$) (**Fig. 41**).



Niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo lipídico en los hígados de la descendencia de 140 días de edad.

Por RT-qPCR decidimos evaluar en el hígado de la descendencia de 140 días de edad los niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y en la inflamación.

➤ Factores de transcripción involucrados en el metabolismo lipídico.

Se evaluaron los niveles de ARN mensajero de dos factores de transcripción *Srebp-1c*, involucrado en procesos anabólicos, y *Lxra*, que regula genes implicados en la homeostasis lipídica y la inflamación, dentro de los cuales se encuentra *Srebp-1c*. En el hígado de la descendencia hembra, observamos un incremento en los niveles de ARN mensajero en ambos factores de transcripción, *Srebp-1c* y *Lxra*, en el grupo DG (CT vs DG, $p < 0,05$) y este incremento fue prevenido por el tratamiento materno con butirato (DG vs DGB, $p < 0,05$) (**Fig. 42A**). En cambio, en la descendencia macho no observamos diferencias significativas en los niveles hepáticos de ARN mensajero de *Lxra* entre los grupos en estudio, mientras que observamos una disminución en los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c* (CT vs DG, $p < 0,05$), que no fue prevenido por el tratamiento con butirato (**Fig. 42B**).

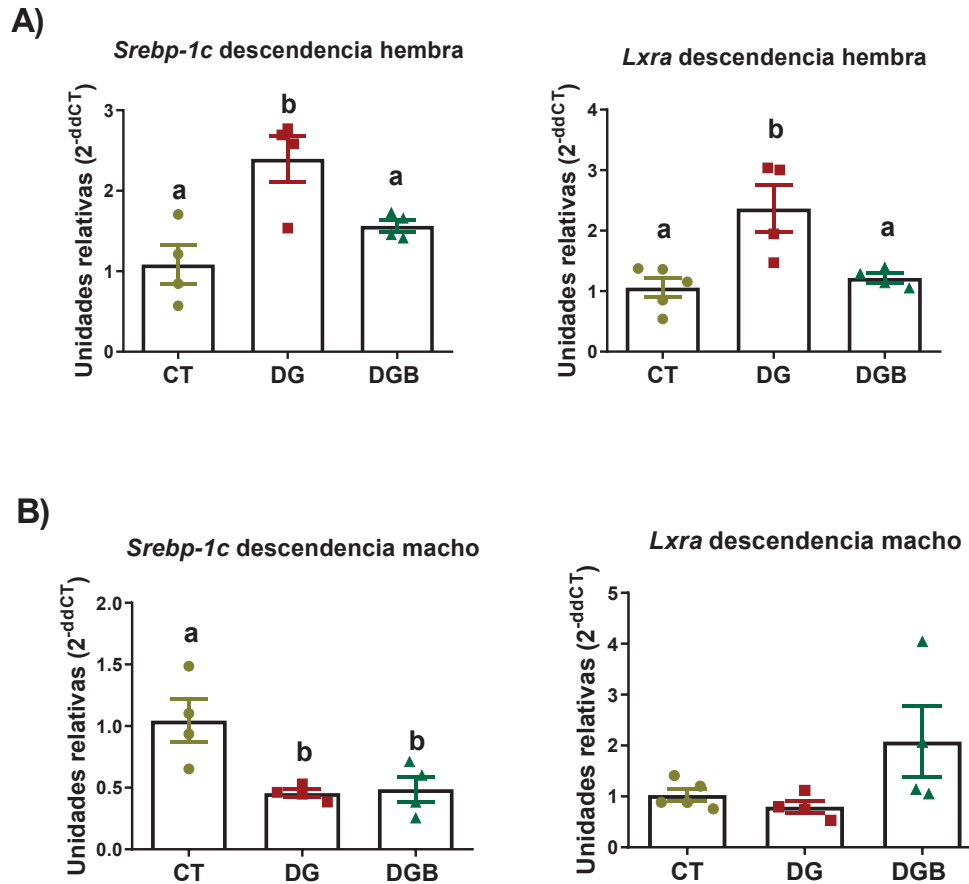


Figura 42. Factores de transcripción involucrados en el metabolismo lipídico en los hígados de la descendencia a los 140 días de edad. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de los factores de transcripción *Srebp-1c* y *Lxra*, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en hígados de la descendencia A) hembra y B) macho a los 140 días de edad provenientes del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

➤ Síntesis de lípidos.

En relación a la síntesis de lípidos, evaluamos los niveles de ARN mensajero de *Acc1* y *Fasn*, y observamos que la descendencia hembra presentó mayores niveles de ARN mensajero de *Acc1* en el grupo DG (CT vs DG, $p < 0,05$), mientras que *Fasn* presentó una tendencia a aumentar ($p = 0,1$) (**Fig. 43**). Observamos que el tratamiento materno con butirato previno el incremento en los niveles de ARN mensajero de *Acc1* evidenciados en

el grupo DG (DG vs DGB, $p < 0,05$) (**Fig. 43**). Por otro lado, en la descendencia macho no observamos cambios en los niveles de ambas enzimas lipogénicas entre los grupos en estudio (**Fig. 43**).

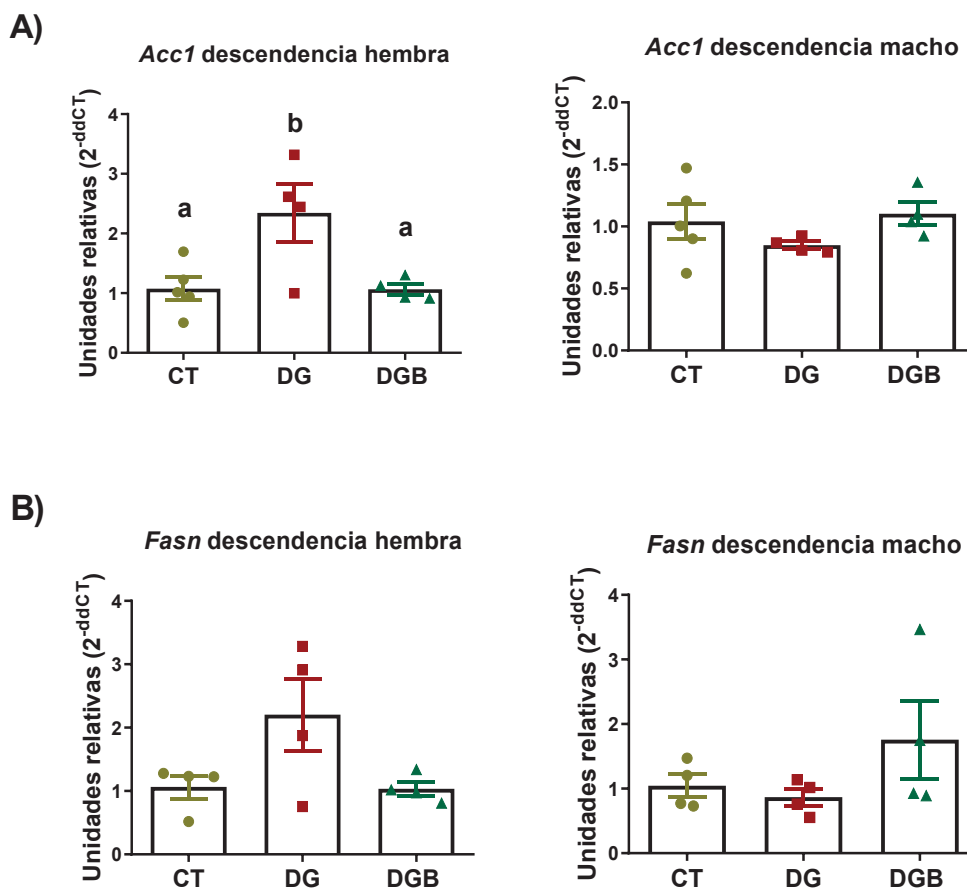


Figura 43. Genes involucrados en la síntesis de lípidos en el hígado de la descendencia a los 140 días de edad. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de: A) *Acc1* y B) *Fasn*, involucrados en la síntesis de lípidos, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en hígados de la descendencia hembra y macho a los 140 días de edad provenientes del grupo de ratas control (CT, $n=5$), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, $n=4$) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, $n=4$). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

➤ Transporte interno de lípidos.

En la descendencia de 140 días de edad no observamos diferencias significativas en los niveles de ARN mensajero de *Fabp5*, relacionado con el transporte intracelular de ácidos grasos, entre los grupos en estudio (**Fig. 44**).

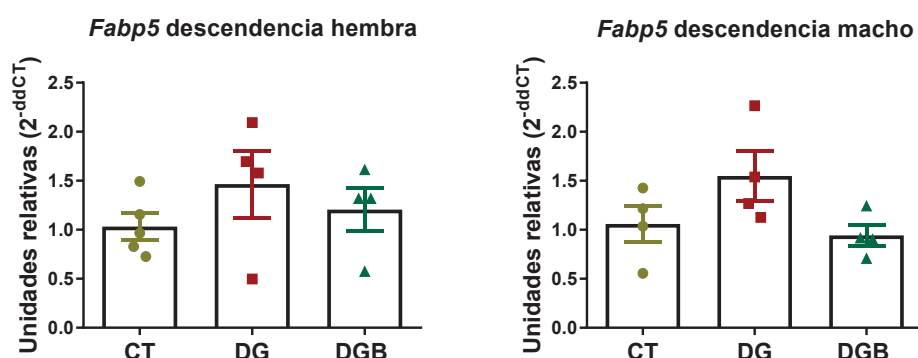


Figura 44. Genes involucrados en el transporte interno de lípidos en el hígado de la descendencia a los 140 días de edad. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de *Fabp5*, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en hígados de la descendencia hembra y macho a los 140 días de edad provenientes del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

➤ Oxidación de lípidos.

Para evaluar la oxidación de ácidos grasos en el hígado de la descendencia adulta del modelo, se midieron los niveles de ARN mensajero de *Cyp4a1*, involucrado en la ω -hidroxilación; *Aco*, enzima que cataliza la β -oxidación peroxisomal de ácidos grasos, *Acaa2* y *Hadha*, ambas enzimas que catalizan la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga en las mitocondrias.

En los hígados de la descendencia hembra, observamos un incremento en los niveles de ARN mensajero de *Cyp4a1* y *Acaa2* en el grupo DG (CT vs DG, $p < 0,05$) (**Fig. 45**) y una tendencia al incremento de los niveles de *Aco* y *Hadha* (CT vs DG, $p = 0,11$). Los incrementos en *Cyp4a1* y *Acaa2* fueron prevenidos en parte por el tratamiento con butirato (DG vs DGB) (**Fig. 45**).

Por otro lado, en los hígados de la descendencia macho, observamos los niveles de ARN mensajero *Cyp4a1* presentaban una tendencia a incrementar en el grupo DG contra el CT (CT vs DG, $p=0,067$), mientras que en el grupo DGB se observa una disminución de los niveles con respecto al DG (DG vs DGB, $p<0,05$) (Fig. 46). En cambio, los niveles de ARN mensajero de *Aco*, *Acaa2* y *Hadha* no presentaron diferencias significativas entre los grupos en estudio (Fig. 46).

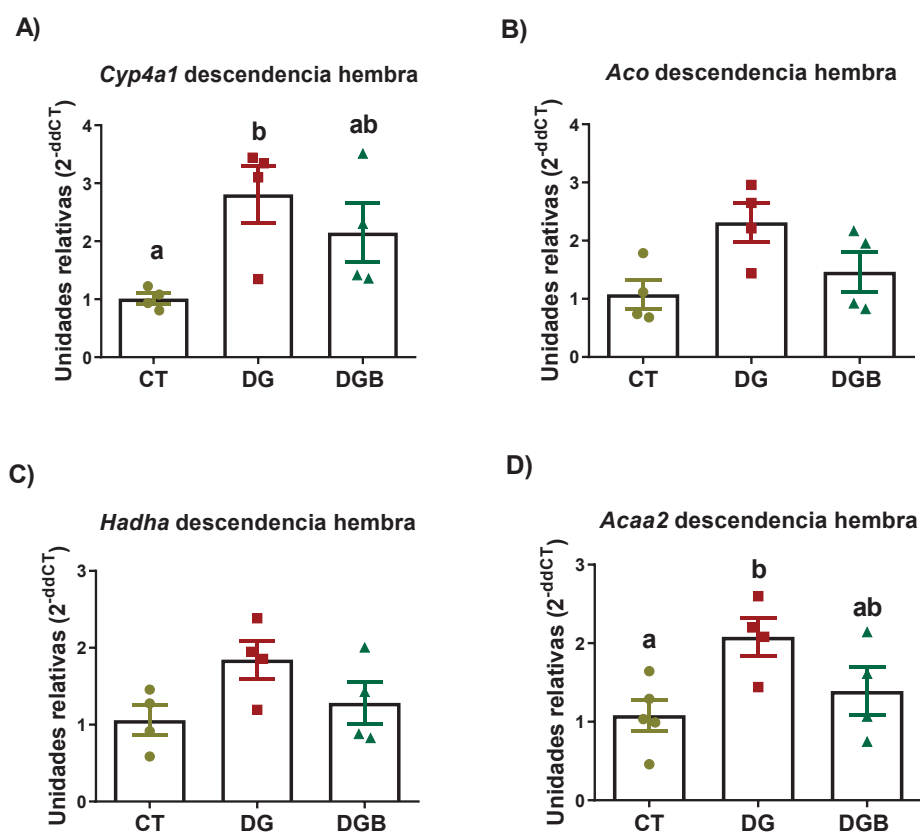


Figura 45. Genes involucrados en la oxidación de lípidos en los hígados de la descendencia hembra a los 140 días de edad. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de: A) *Cyp4a1*, B) *Aco*, C) *Hadha* y D) *Acaa2*, involucrados en la oxidación de lípidos, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en hígados de la descendencia hembra a los 140 días de edad provenientes del grupo de ratas control (CT, $n=5$), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, $n=4$) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, $n=4$). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

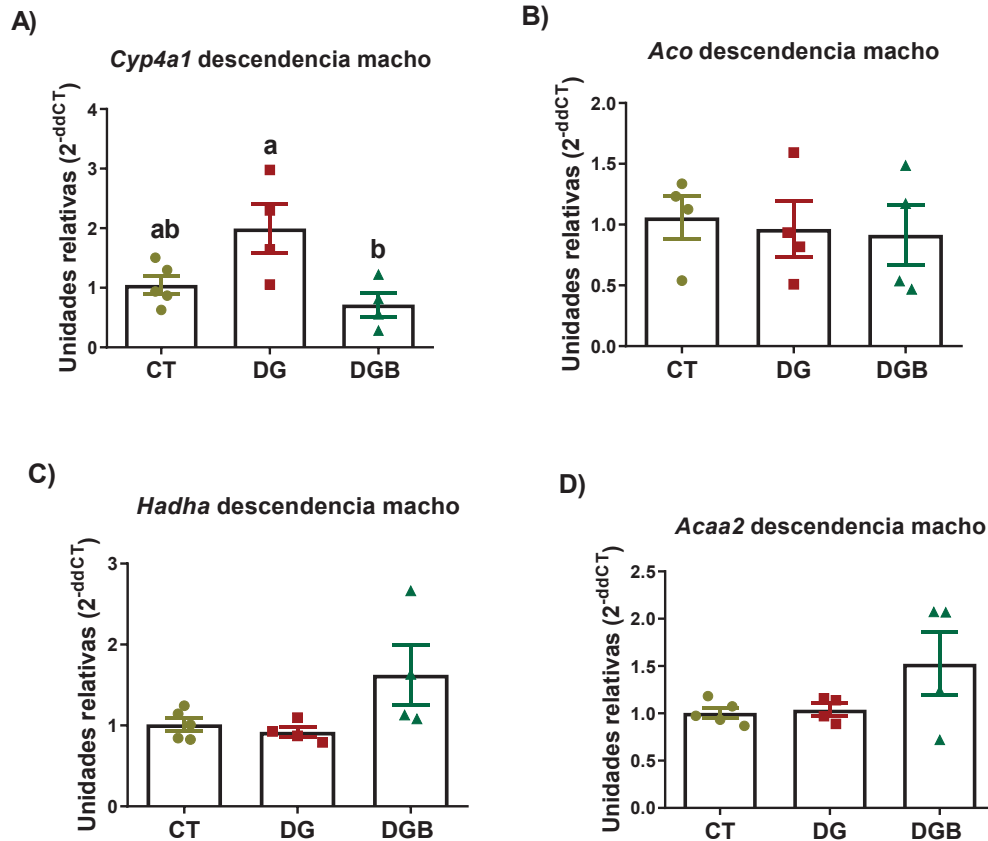


Figura 46. Genes involucrados en la oxidación de lípidos en los hígados de la descendencia macho a los 140 días de edad. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de: A) *Cyp4a1*, B) *Aco*, C) *Hadha* y D) *Acaa2*, involucrados en la oxidación de lípidos, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en hígados de la descendencia macho a los 140 días de edad provenientes del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

➤ Inflamación.

Evaluamos los niveles de ARN mensajero de *Nlrp3*, inflammasoma que favorece la secreción de interleuquinas proinflamatorias, y de la *Il-18* en los hígados de la descendencia a los 140 días de edad. Observamos que el sobrepeso materno induce un incremento de los niveles de ARN mensajero de *Nlrp3* (CT vs DG, $p < 0,05$) y una tendencia al incremento de *Il-18* en los hígados de la descendencia hembra (CT vs DG, $p = 0,11$), que fue prevenido por el tratamiento materno con butirato (DG vs DGB, $p < 0,05$)

(Fig. 47A). Los hígados de la descendencia macho de 140 días de edad no presentaron diferencias en los niveles de ARN mensajero de *Nlrp3* en los grupos en estudio, aunque el sobrepeso materno si incrementó los niveles de ARN mensajero de *Il-18* (CT vs DG, $p<0,05$), incremento prevenido por el tratamiento con butirato (DG vs DGB, $p<0,05$) (Fig. 47B).

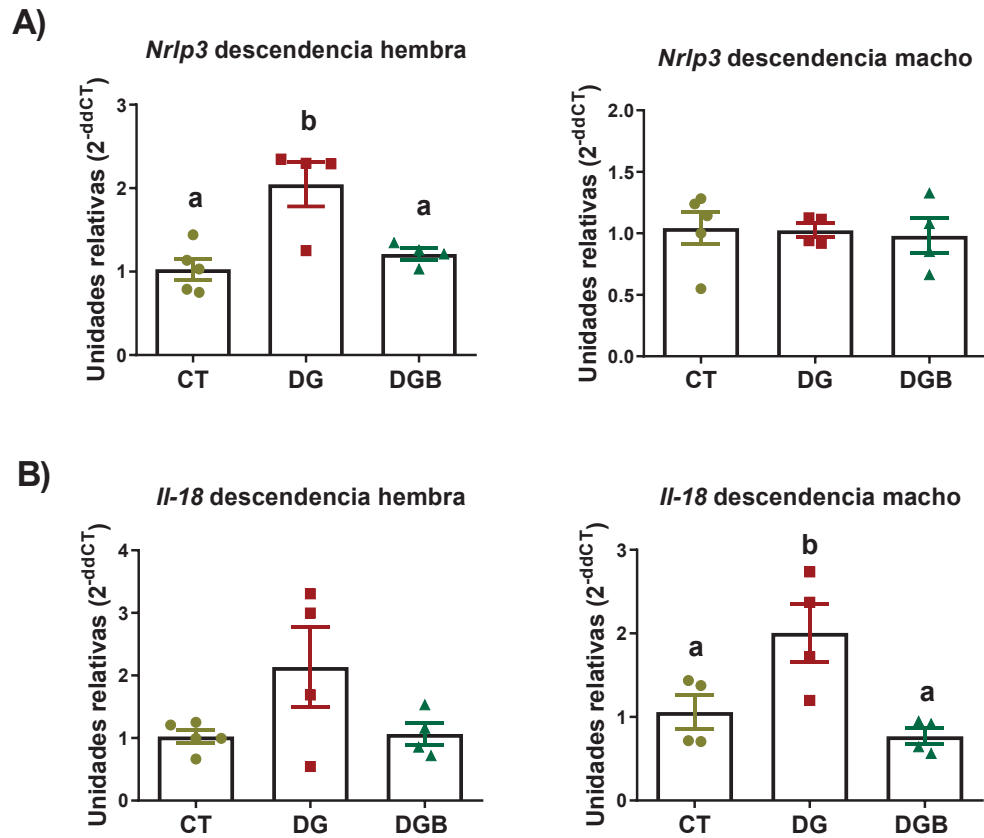
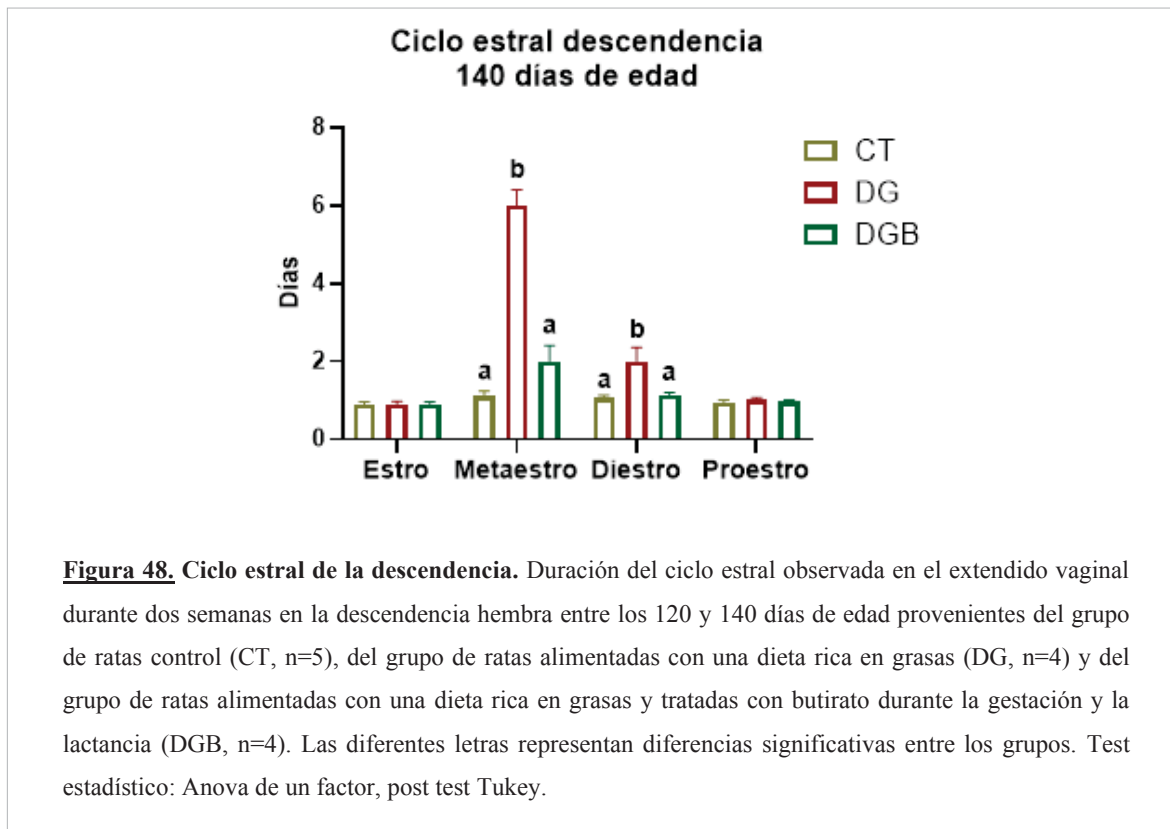


Figura 47. Genes involucrados en la inflamación en los hígados de la descendencia a los 140 días de edad. Niveles de ARN mensajero evaluados por RT-qPCR de: A) *Nlrp3* y B) *Il-18*, relativos a la media geométrica de los genes de referencia *s18*, *L32* y $\beta 2\mu G$ en hígados de la descendencia hembra y macho a los 140 días de edad provenientes del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

Parámetros reproductivos.

El sobrepeso materno puede alterar el desarrollo de los órganos reproductivos en la descendencia, aumentando el riesgo de disfunciones reproductivas, como problemas en la fertilidad y el desarrollo de enfermedades en los órganos reproductivos, debido a cambios epigenéticos y desequilibrios hormonales inducidos por el ambiente uterino adverso (Rhind et al., 2001; Yao et al., 2021).

Para evaluar si el sobrepeso materno altera el potencial reproductor de la descendencia, se evaluaron algunos parámetros reproductivos en las mismas. En las hembras, evaluamos el ciclo estral por dos semanas previas a la eutanasia y vimos que la descendencia del grupo DG presentaba una mayor duración media del ciclo estral, con un arresto en el estadio metaestro y diestro, resultando en una prolongación temporal del ciclo (CT vs DG; $p < 0,05$) (**Fig. 48**). El tratamiento materno con butirato durante la preñez y la lactancia previno la alteración en la duración de los estadios del ciclo estral (DG vs DGB, $p < 0,05$) (**Fig. 48**).



En relación a la descendencia macho, se detallan a continuación algunos de los principales parámetros reproductivos característicos de la maduración sexual, para evaluar si el sobrepeso materno fue capaz de modificar el potencial reproductor y cuál es el efecto del tratamiento materno con butirato sobre el mismo. El índice testicular, que relaciona el peso testicular medio con el peso corporal del animal en el momento de la eutanasia, mostró un incremento en el grupo DG (CT vs DG, $p<0,05$), que fue prevenido por el butirato (DG vs DGB, $p<0,05$) (**Fig. 49A**). No observamos diferencias significativas en el índice epididimal, que relaciona el peso epididimal medio con el peso corporal del animal en el momento de la eutanasia, entre los grupos en estudio (**Fig. 49B**). Observamos una disminución en la longitud testicular en ambos grupos de dieta grasa, DG y DGB (CT vs DG y CT vs DGB, $p<0,05$) (**Fig. 49C**), pero no hubo cambios en la longitud epididimal entre los grupos en estudio (**Fig. 49D**).

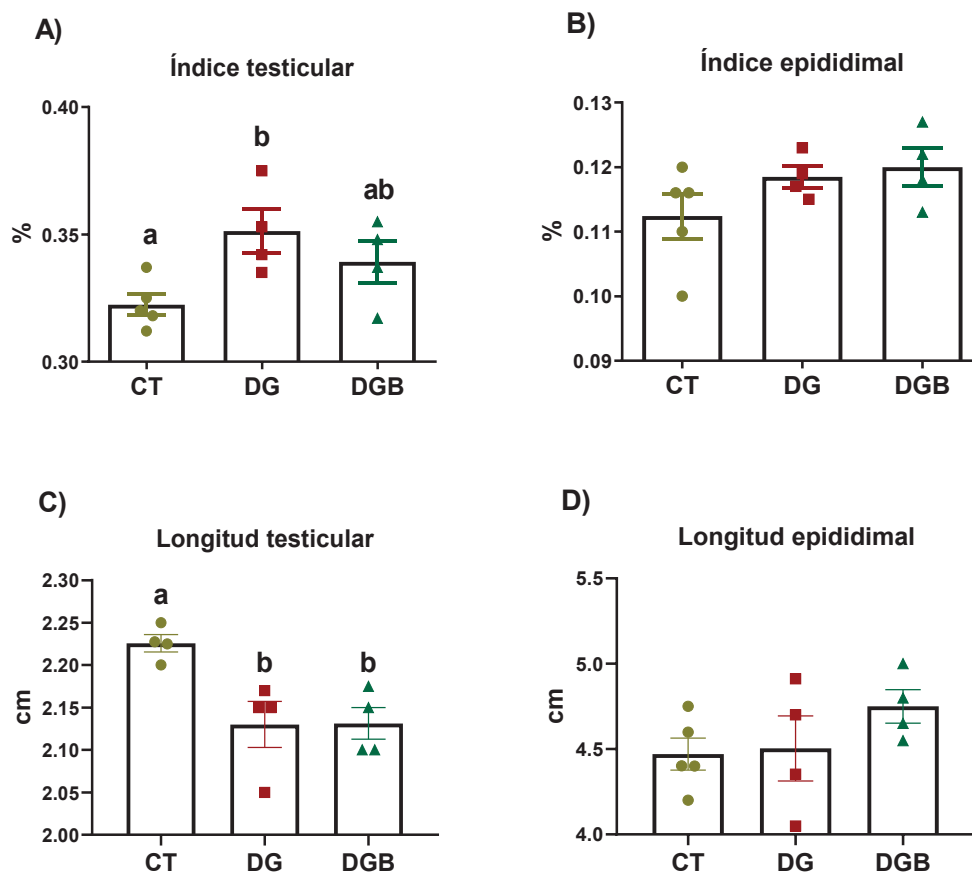


Figura 49. Parámetros reproductivos en la descendencia macho. A) índice testicular, B) índice epididimal, C) longitud testicular y D) longitud epididimal de la descendencia macho a los 140 días de edad provenientes del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

Parámetros espermáticos.

En relación a los parámetros espermáticos medidos, observamos una disminución en la motilidad de los espermatozoides en la descendencia macho del grupo DG (CT vs DG, $p < 0,05$), alteración que no se observó cuando la madre fue tratada con butirato (DG vs DGB) (**Fig. 50A**). El recuento de espermatozoides no presentó diferencias significativas entre los grupos en estudio (**Fig. 50B**).

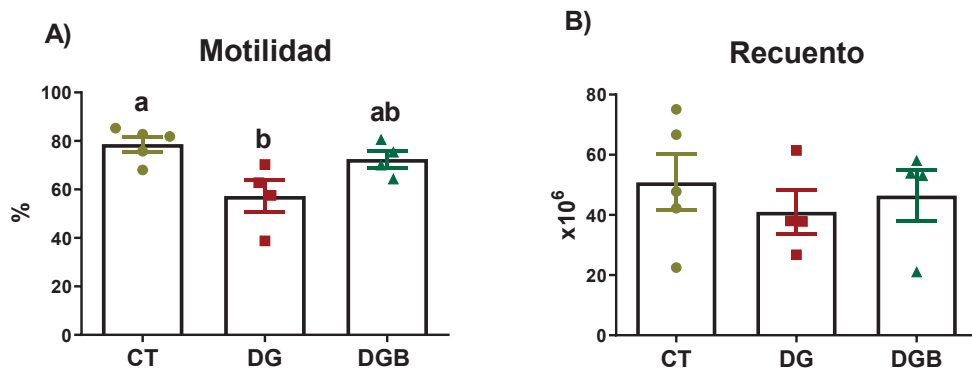


Figura 50. Parámetros espermáticos. A) motilidad espermática y B) recuento espermático de la descendencia macho a los 140 días de edad provenientes del grupo de ratas control (CT, n=5), del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (DG, n=4) y del grupo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con butirato durante la gestación y la lactancia (DGB, n=4). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los grupos. Test estadístico: Anova de un factor, post test Tukey.

Conclusiones Capítulo 6:

En el presente capítulo observamos que la descendencia de 140 días de edad de madre con sobrepeso no presentó diferencias de peso, como tampoco en los niveles de lípidos circulantes. A pesar de eso, se observó una disminución en el peso relativo del tejido adiposo en la descendencia de ambos sexos en el grupo DGB, que está relacionada con una disminución en el contorno corporal. De manera interesante, observamos un incremento en las transaminasas en el grupo DG, prevenido en parte por el tratamiento materno con butirato. Estos efectos son más notorios en machos que en hembras.

Los hígados de la descendencia de 140 días de edad de ratas con sobrepeso presentaron una sobreacumulación de lípidos, a pesar de no presentar cambios en su peso y en los lípidos circulantes. Además, presentaron diferencias sexo-dependientes en cuanto a los niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo lipídico, observándose más alteraciones en la descendencia hembra que en la descendencia macho. Aun así, se observa una mayor acumulación lipídica y un mayor daño oxidativo en ambos sexos, evidenciando la presencia de alteraciones hepáticas.

El tratamiento materno con butirato previno la sobreacumulación de lípidos hepáticos en la descendencia de 140 días de edad, las alteraciones en los niveles de ARN mensajero de genes involucrados en el metabolismo lipídico, el daño oxidativo y las alteraciones en los niveles de ARN mensajero de genes involucrado en el inflammasoma, lo que en conjunto evidencia una mejora de la condición de la enfermedad de hígado graso.

Se observaron alteraciones en los parámetros reproductivos en la descendencia DG, en hembras una mayor duración del ciclo estral y en machos un mayor índice testicular y menor motilidad espermática, alteraciones prevenidas tanto en machos como en hembras en el grupo DGB, lo que podría traer consecuencias transgeneracionales.

5. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La hipótesis de los orígenes en el desarrollo de la salud y la enfermedad abrió un nuevo paradigma de estudio sobre cómo un entorno intrauterino adverso influye en la descendencia, aumentando la susceptibilidad de desarrollar enfermedades metabólicas. Tanto la vida intrauterina como los primeros días postnatales son ventanas críticas en las que el entorno materno influye en el correcto desarrollo del feto. Durante estas etapas, fetos y lactantes interactúan nutrientes, hormonas, metabolitos y sustancias que intervienen en el balance de inflamación y de oxidación, que reflejan el estado metabólico materno, lo que podría comprometer la salud y la respuesta adaptativa a potenciales desafíos ambientales adicionales en el futuro (Jansson and Powell, 2007; Drake and Seckl, 2011; Lane et al., 2014; Lindsay et al., 2019).

La obesidad materna ha sido ampliamente estudiada bajo este concepto, especialmente en modelos expuestos a dietas ricas en grasas. En estos modelos, la descendencia de madres con obesidad muestra un aumento en la adiposidad, resistencia a la insulina e hipertensión, lo que evidencia programación intrauterina de alteraciones metabólicas (Jawerbaum and White, 2017; Fernandez-Twinn et al., 2019; Scheidl et al., 2023a). Los roedores, en particular las ratas, son comúnmente utilizados en estos estudios debido a su corto periodo gestacional y las similitudes metabólicas con los humanos, con pocas diferencias en el desarrollo. Estudios recientes también han empleado dietas ricas en grasas y azúcares para inducir obesidad materna, resultando en la descendencia que presenta hiperfagia, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa en la edad adulta (Marques et al., 2016; Jawerbaum and White, 2017; Grzęda et al., 2022). Estos hallazgos subrayan la importancia de entender cómo el entorno materno afecta el desarrollo metabólico de la descendencia y su salud a largo plazo, y de diseñar intervenciones beneficiosas para generaciones futuras.

En la presente tesis utilizamos un modelo de obesidad materna dado por un incremento en la ingesta de grasas saturadas de manera previa y durante la gestación y la lactancia de ratas. En trabajos previos, estudiamos algunas alteraciones en la madre, la placenta, los fetos y la descendencia de rata con sobrepeso (Gaccioli et al., 2013; Mazzucco et al., 2013a, 2016; Heinecke et al., 2020, 2024). El modelo estudiado en este trabajo reproduce algunas de las características presentes en mujeres embarazadas que

desarrollan sobrepeso y obesidad previamente. Esto nos permitió estudiar alteraciones metabólicas de la descendencia que tendrían su inicio durante la vida intrauterina y que permanecerían en la vida adulta afectando su salud metabólica. Se utilizó una dieta con un 26% de grasas saturadas que representa el 48% del aporte calórico total, a diferencia de las dietas estándar que tienen entre 5-10% de grasas y que representan entre 12-24% del aporte calórico total. De acuerdo con el corto ciclo de vida y tiempo reproductivo de los roedores, las dietas que inducen sobrepeso deben tener entre 30-60% de contenido calórico proveniente de grasas para ser efectivas (Ghibaudi et al., 2002; Carpenter et al., 2013; Speakman, 2019; De Moura E Dias et al., 2021). En el modelo utilizado, como ya se mencionó, el 48% de las calorías provienen de la grasa, valor intermedio en comparación al de otras dietas con exceso de grasas utilizadas en roedores (Ghibaudi et al., 2002; Niculescu and Lupu, 2009; Hariri and Thibault, 2010; Carpenter et al., 2013; Jawerbaum and White, 2017; De Moura E Dias et al., 2021). Mediante la administración de esta dieta se logró un incremento de un 13% de peso de manera previa a la gestación, valor similar al observado en otros modelos de alrededor de 45% de aporte calórico por parte de las grasas (Ghibaudi et al., 2002; Férézou-Viala et al., 2007; C. M. Reynolds et al., 2015; Doulberis et al., 2020; De Moura E Dias et al., 2021) y menor respecto al observado en roedores alimentados con dietas que contienen un 60% aporte calórico proveniente de las grasas (Niculescu and Lupu, 2009; Liang et al., 2010; Carpenter et al., 2013; Doulberis et al., 2020; De Moura E Dias et al., 2021). Además de inducir el sobrepeso en la rata progenitora, esta dieta incrementó la adiposidad y los triglicéridos circulantes, sin alterar la glucemia o la tolerancia a la glucosa, lo que indica que no es un modelo de diabetes (Heinecke et al., 2024), como ocurre con la alimentación con un 60% de aporte calórico de grasas (Liang et al., 2010).

Además del incremento de peso, adiposidad y triglicéridos circulantes en las progenitoras, evidenciamos un mayor número de fetos vivos al día 21 de gestación y un aumento del peso corporal del feto, resultados similares a los obtenidos por nuestro y otros grupos de trabajo (Mazzucco et al., 2013a; Catalano and Shankar, 2017; Bazzano et al., 2021; Meneghini et al., 2024). El sobrepeso fetal es un indicador de alteraciones en el programa que regirá el metabolismo del individuo en el futuro y se asocia con un mayor riesgo de obesidad y diabetes en la adultez (Lewis and Desoye, 2017). *Nuestro modelo refleja la problemática del sobrepeso fetal causada por la alimentación materna rica en grasas y es adecuado para el estudio de las anomalías generadas a partir del sobrepeso*

materno. En este trabajo, nos planteamos el objetivo de profundizar en el estudio de las alteraciones metabólicas de la progenitora, las placentas y la descendencia de rata con sobrepeso y de diseñar una estrategia terapéutica durante la preñez que previniera el desarrollo del programa metabólico perjudicial para la descendencia y las alteraciones de la progenitora.

En la actualidad, está bien establecido el rol metabólico que tiene el intestino y la microbiota intestinal (Fava et al., 2019). Se ha reportado que el contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como el butirato, en el colon y en las heces está disminuido en gestantes con sobrepeso y obesidad (Ziętek et al., 2021). Varios estudios en ensayos preclínicos y clínicos, han demostrado el efecto protector del butirato contra la obesidad y patologías asociadas a la obesidad (Serena Coppola et al., 2021), mostrando una disminución en la esteatosis hepática, en el IMC, en los niveles de sustancias proinflamatorias y en los depósitos de lípidos, y una mejora en la sensibilidad a la insulina (Anachad et al., 2023; Mayorga-Ramos et al., 2022). En modelos animales sin preñez, Sun B. y colaboradores han observado que en ratas macho, que habían recibido butirato en una concentración de 300mg/kg, se reducía el estrés oxidativo (Sun et al., 2018, 2019). Además, Jin CJ y colaboradores observaron que la administración de butirato en una concentración de 600mg/kg a ratones lograba reducir los depósitos de lípidos, el daño y la inflamación hepática (Jin et al., 2015). En modelos animales de preñez, se ha observado que la administración de butirato de entre 1% y 5% m/m de alimento logra atenuar algunas de las alteraciones inducidas por la dieta materna, aumentando la capacidad antioxidante en la madre, la placenta y el feto (Lin et al., 2014)(Lin et al., 2014)(Li et al., 2013b; Lin et al., 2014; Huang et al., 2022). En nuestro trabajo, utilizamos butirato en una concentración 3% m/m de alimento durante la gestación, administrado de manera diaria y oralmente. *A lo largo de este trabajo hemos descripto varios efectos beneficiosos de la administración materna de butirato sobre la gestante, las placentas, los fetos y la descendencia de rata con sobrepeso.*

El incremento en el número de fetos inducido por el sobrepeso materno podría estar vinculado a la tasa ovulatoria como mencionan otros autores (Galarza et al., 2017). Por otro lado, observamos un incremento en la cantidad de fetos inducido por el butirato. Se ha reportado previamente que el butirato promueve el incremento en el número fetal y la reducción en la tasa de abortos (Lin et al., 2014). En nuestro modelo no hemos observado variaciones en la tasa de reabsorción por el tratamiento materno. Mas aún,

parecería haber un efecto aditivo del sobrepeso materno y del tratamiento con butirato al observar un mayor número de fetos viables al día 21 de gestación, probablemente debido a un incremento en la tasa ovulatoria y el éxito implantatorio.

Los factores que intervienen en la determinación del peso fetal y placentario son varios, entre ellos, factores de crecimiento y hormonales, la afluencia de nutrientes y la angiogénesis (Mark et al., 2011; Hayes et al., 2012; Mazzucco et al., 2013b; D. W. Kim et al., 2014; Bellisario et al., 2015; Wang et al., 2015; Sferruzzi-Perri and Camm, 2016; Meneghini et al., 2024). Se ha establecido que el sobrepeso fetal o neonatal está relacionado con una mayor afluencia de lípidos a través de la placenta (Lewis and Desoye, 2017). El incremento en la biodisponibilidad de triglicéridos materna podría ser la causa del sobrepeso fetal observado en este trabajo. Fue de suma importancia encontrar que el butirato, que previene la hipertrigliceridemia materna, también lo hace con el sobrepeso fetal, confirmando una vez más la vinculación entre los dos eventos. *En resultados que se mostraron en la parte B de la presente tesis pudimos corroborar que la prevención del sobrepeso fetal por el butirato también se tradujo como una mejora en el programa metabólico de la descendencia.*

En nuestro modelo, evidenciamos que las madres con sobrepeso al día 21 de gestación presentaron incrementos en la trigliceridemia, sin cambios en la colesterolemia ni en la glucemia, junto con un incremento en los niveles circulantes de IL-1 β y en la masa del tejido adiposo. Estos parámetros se observaron en otros modelos y en mujeres embarazadas con obesidad (Hariri and Thibault, 2010; Yokomizo et al., 2014; Marques et al., 2016; Wierzchowska-Opoka et al., 2023; Beneventi et al., 2025). De manera interesante, el tratamiento oral con butirato previno el incremento en los niveles circulantes de triglicéridos y de IL-1 β en las madres DGB, manteniéndose el incremento en la masa del tejido adiposo, mientras que el mismo tratamiento no produjo cambios en el grupo CTB. Un único trabajo ha reportado que la adición de butirato durante la gestación y el periodo de lactancia promueve la movilización de la grasa materna y favorece la acumulación en los tejidos de la descendencia (Zhou et al., 2016), mientras que la mayoría de los estudios observaron una disminución de los lípidos circulantes, de la inflamación sistémica, de la masa del tejido adiposo, del IMC y del estrés oxidativo en la madre, la placenta y el feto, previniendo el desarrollo de hígado graso (Huang et al., 2022; Jin et al., 2015; Li et al., 2013b; Lin et al., 2014; Sun et al., 2019, 2018). En nuestro modelo, el tratamiento con butirato no produjo cambios en la masa de tejido adiposo

materno, probablemente por la dosis y/o por el tiempo de exposición. Sin embargo, y dado que la conservación del tejido adiposo es importante para una liberación adecuada de lípidos hacia el final de la gestación, creemos que la ausencia de cambios en este sentido resulta beneficiosa para los fetos en desarrollo, en los que, como evidenciamos, se previno el sobrepeso y la sobreacumulación lipídica hepática, clave en la programación metabólica.

En situaciones de alta concentración de lípidos circulantes y resistencia a la insulina, el metabolismo lipídico en el tejido adiposo se ve alterado, lo que conduce a hiperlipidemia e incrementa la captación hepática de lípidos (Bradbury, 2006; Cusi, 2012; Blüher, 2019). Observamos que los hígados de las madres DG al día 21 de gestación presentaban una sobreacumulación de lípidos y que el tratamiento con butirato acentuaba la acumulación de triglicéridos y ésteres de colesterol, probablemente a expensas de una disminución en los ácidos grasos libres tisulares. El butirato, además, parecería actuar sobre el exceso de lípidos que caracteriza al grupo DG, dado que el grupo CTB no presentó diferencias en el contenido lipídico en los hígados con respecto a lo observado en el grupo CT. El exceso de grasas en la dieta promueve la acumulación de lípidos en el tejido adiposo y luego comienza a almacenarse en otros tejidos, incluido el hígado. Esto favorece el desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), como se ha demostrado en distintos trabajos (Wardani et al., 2019; Lian et al., 2020; Eng and Estall, 2021). En trabajos en donde se administró butirato en modelos sin preñez, el AGCC disminuye el contenido hepático de lípidos (Sun et al., 2018, 2019; Zhang et al., 2021). En nuestro modelo, el sobrepeso es previo a la gestación, cuando probablemente ya esté establecida la acumulación de lípidos en el hígado y por ello el tratamiento con butirato durante la preñez no pudo prevenirla. Además, como mencionamos anteriormente, el butirato aumenta la sensibilidad a la insulina, favoreciendo la acumulación de lípidos para luego favorecer las vías de oxidación y reducir los depósitos de lípidos (Serena Coppola et al., 2021). En este modelo de obesidad y preñez, las características propias de la fisiología de la gestación podrían intervenir resultando en la sobreacumulación observada en el grupo DGB.

En nuestro trabajo evidenciamos una depresión en las vías de síntesis y oxidación en el hígado materno de ambos grupos DG y DGB, probablemente por el incremento en la disponibilidad de nutrientes dada por la dieta. Trabajos previos del laboratorio evidenciaron hiperinsulinemia en las madres DG al día 21 de gestación (Mazzucco et al.,

2013a). La resistencia a la insulina y la presencia de elevados niveles de triglicéridos en circulación son características frecuentes en gestantes con sobrepeso u obesidad (Marseglia et al., 2014; Bandres-Meriz et al., 2020; Beneventi et al., 2025). Por otro lado, observamos un incremento de los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c* en el grupo DGB, cuyos efectos anabólicos conocidos permitirían la esterificación de ácidos grasos en moléculas más estables como triglicéridos y ésteres de colesterol (Chandrasekaran and Weiskirchen, 2024). El incremento en la acumulación de estas especies lipídicas y en los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c* en el hígado, junto con la prevención del incremento en los niveles de triglicéridos circulantes en las madres DGB, es tal vez atribuible a una mejora en la sensibilidad a la insulina como lo observaron en algunos ensayos clínicos (Ilyés et al., 2022; Mayorga-Ramos et al., 2022; Chandrasekaran and Weiskirchen, 2024). *Con estos resultados nos pareció importante estudiar el efecto de los tratamientos maternos sobre la salud de la madre, y en particular del hígado, ya que evidenciamos mejoras en el metabolismo fetal que podrían atenuar la programación de alteraciones metabólicas en la descendencia, pero parecen tener un alto costo para la salud materna. Por ello, y como se discutirá más adelante, evaluamos el efecto del butirato sobre la madre una vez finalizada la lactancia y cómo impacta en la descendencia.*

La placenta es el órgano de intercambio materno-fetal. Alteraciones en su estructura o función frente a cambios en el entorno intrauterino, como por ejemplo los de origen dietario, afectan el transporte de nutrientes placentario y condicionan la disponibilidad de nutrientes por parte del feto y en consecuencia su crecimiento y desarrollo (Myatt and Maloyan, 2016; Furukawa et al., 2019; Fowden et al., 2020; Kramer et al., 2023). En la presente tesis, evidenciamos un menor peso placentario en el grupo DG y una correlación entre el peso placentario y el número de fetos. En nuestro trabajo, parecería ser que el exceso de grasas induce un aumento del número de implantes y del peso fetal, pero no del peso placentario, que parece estar más relacionado con la cantidad de implantes. Los modelos de obesidad presentan o no variaciones en el peso placentario (Jansson and Powell, 2007; Mark et al., 2011; Vaughan et al., 2012; Hayes et al., 2012; Mazzucco et al., 2013a; Furukawa et al., 2014; Sferruzzi-Perri and Camm, 2016; Jawerbaum and White, 2017; Furukawa et al., 2019; Fowden et al., 2020). En aquellos modelos en los que la superficie de intercambio está comprometida, la respuesta adaptativa placentaria es incrementar el tamaño y puede presentar además retraso de

crecimiento intrauterino (RCIU) (Jansson and Powell, 2007). Esto no ocurre en nuestro modelo y, lejos de observarse RCIU, se observa sobrecrecimiento fetal, por lo que inferimos que la superficie de intercambio no se encontraría comprometida y el transporte placentario de nutrientes cubriría la demanda fetal.

El sobrepeso materno induce alteraciones en el transporte y/o acumulación de lípidos placentarios. El exceso de lípidos puede además inducir estrés oxidativo y lipotoxicidad placentaria con efectos nocivos para la función placentaria y para el feto (Mazzucco et al., 2013a; Calabuig-Navarro et al., 2017; Lewis and Desoye, 2017; Louwagie et al., 2018). Al día 21 de gestación, las placentas del grupo DG presentaron sobreacumulación lipídica de todas las especies analizadas, y alteraciones en los niveles de ARN mensajero de enzimas del metabolismo de ácidos grasos, con algunas diferencias sexo-dependientes. El tratamiento materno con butirato pudo prevenir en parte la expresión de moduladores del transporte placentario de lípidos, a pesar de persistir la acumulación lipídica, también con una respuesta sexo-dependiente. Los mecanismos detrás del dimorfismo sexual en la placenta en el contexto de la obesidad aún no se comprenden completamente, pero se han asociado diferencias sexuales con niveles plasmáticos de hormonas esteroideas (Clifton, 2010; Sferruzzi-Perri and Camm, 2016; Maliqueo et al., 2017). Entonces, existe una compleja interacción entre el sexo fetal, los niveles hormonales y los factores ambientales, como la obesidad materna, que pueden influir en la función y el desarrollo de la placenta, y en el transporte de nutrientes al feto en desarrollo (Sathishkumar et al., 2012; D. W. Kim et al., 2014; Myatt and Maloyan, 2016; Duttaroy and Basak, 2022).

En particular, en las placentas hembra pertenecientes al grupo DG observamos un incremento de los niveles de ARN mensajero de *Lpl*, involucrada en la incorporación de lípidos, de *Plin2* y *Fabp5*, junto con un incremento en los niveles proteicos de PLIN2 y FABP4, involucrados en el tráfico interno de lípidos y contención de las gotas lipídicas, en concordancia con la sobreacumulación observada y el incremento de la trigliceridemia materna. Varios trabajos han encontrado alteraciones en la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de lípidos en las placentas de gestantes con obesidad en el contexto de la sobreacumulación de lípidos (Dubé et al., 2012; Herrera and Ortega-Senovilla, 2014; Lager et al., 2016; Myatt and Maloyan, 2016; Hirschmugl et al., 2017; Calabuig-Navarro et al., 2017; Álvarez et al., 2020).

En las placentas de fetos hembra de nuestro modelo, el tratamiento con butirato previno el incremento de los transportadores *Lpl* y de FABP4, aunque incrementó la expresión de los transportadores CD36 y *Lip g*. Además, los niveles de *Fabp5* y PLIN2 se mantuvieron elevados, en línea con la persistencia de la sobreacumulación lipídica. Por otro lado, los niveles de ARN mensajero de *Fas* y *Aco*, enzimas de síntesis y oxidación lipídica, se encontraron disminuidos. Podemos inferir que en contexto de la obesidad, con altos niveles de lípidos circulantes, se sobreexpresan *Lpl* y FABP4 que favorecen la incorporación de lípidos y que además se encuentran vinculadas a la sensibilidad a la insulina (Herrera and Ortega-Senovilla, 2014; Myatt and Maloyan, 2016). De manera diferente, en el contexto de la normalización de la trigliceridemia, debido al tratamiento con butirato, estos incrementos se previenen. Los incrementos en PLIN2 y *Fabp5* se observaron en los dos contextos maternos DG y DGB, probablemente en línea con la sobreacumulación placentaria de lípidos. La persistencia de la sobreacumulación de lípidos en ausencia de niveles elevados de triglicéridos circulantes, podría ser ocasionado por el incremento en la expresión CD36 y *Lip g*. Dado que el tratamiento con butirato incrementa la expresión de *Cd36* en placentas de fetos hembra del control, podríamos decir que el incremento en *Cd36* obedecería a un accionar de butirato independiente del contexto y de manera dependiente del sexo, mientras que *Lip g* obedecería a efectos indirectos sobre la salud materna.

De manera similar a lo observado en hembras, las placentas de fetos macho del grupo DG mostraron sobreacumulación lipídica vinculada probablemente al incremento del transportador FABP4. De manera diferente, en el grupo DGB dicho incremento no se observa a pesar de acentuarse la acumulación lipídica con respecto al grupo DG. Probablemente, dicho incremento podría vincularse con una mayor expresión de *Lpl*, *Fabp5*, CD36 y PLIN2 en el grupo DGB, lo que podría resultar en un incremento de la internalización, transporte y acumulación tisular de lípidos.

El accionar del tratamiento del butirato sobre la placenta, es aún poco claro y no podemos dilucidar si los cambios moleculares del grupo DGB son causa o simplemente se asocian a las diferencias dependientes del sexo en la acumulación placentaria de lípidos. Otros han evidenciado que el butirato previene los efectos proinflamatorios y prooxidantes en las placentas de modelos de obesidad (Lin et al., 2014). De nuestro trabajo podemos inferir, como se discutirá más adelante en la sección de fetos, que los efectos del butirato sobre las placentas de los machos parecen ser perjudiciales, y en las

hembras no, sin embargo el mismo tratamiento parece tener efectos más beneficiosos en los fetos macho que en el caso de las hembras, soslayando un efecto protector de la placenta de los machos en el grupo DGB, que no es tan marcado en las hembras.

Es posible que la disminución en la trigliceridemia materna observada en el grupo DGB con respecto al DG sea consecuencia de un aumento en la internalización de lípidos tanto en la placenta como en los tejidos maternos. Tal como se vio anteriormente (Fornes et al., 2022; Shook et al., 2023), nuestros hallazgos refuerzan la existencia de un dimorfismo sexual en el metabolismo placentario, donde el tratamiento con butirato moduló diferencialmente la expresión de genes clave en el metabolismo lipídico. *Estos resultados subrayan el papel clave de la placenta en la regulación del exceso de lípidos maternos, con mecanismos que varían según el sexo fetal y responden tanto a la obesidad materna como a la intervención con butirato. Trabajos futuros son necesarios para profundizar en los mecanismos subyacentes al dimorfismo sexual y su impacto en la placenta y el feto en desarrollo.*

Como ya se mencionó previamente, son varios autores los que mencionan un incremento en el peso fetal debido al sobrepeso materno (Gaccioli et al., 2013; Mazzucco et al., 2013a; Parisi et al., 2021; Beneventi et al., 2025). En neonatos humanos el incremento en el peso fetal se debe principalmente al incremento de la adiposidad (Desoye and Herrera, 2021; Lecoutre et al., 2023; Scheidl et al., 2023b). En los roedores, la diferenciación de tejido adiposo ocurre durante la vida postnatal, por lo que el sobrepeso se corresponde con un incremento del peso general de todos los órganos (Jawerbaum and White, 2017). El sobrepeso fetal y la sobreacumulación lipídica hepática son indicadores pronósticos del desarrollo de anomalías metabólicas futuras. En nuestro trabajo, no observamos organomegalia fetal debido al sobrepeso materno, pero si un incremento en la acumulación de lípidos hepáticos, prevenida en parte por el tratamiento con butirato, lo que podría mejorar el programa metabólico de la descendencia de rata con obesidad.

En relación a los fetos, observamos que el sobrepeso materno indujo una disminución en la trigliceridemia en ambos sexos, junto con un incremento en la actividad de la transaminasa ALT y una sobreacumulación de lípidos en el hígado fetal. Estos resultados se han observado previamente en modelos de sobrepeso y obesidad materna (Pruis et al., 2014; Fernandez-Twinn et al., 2019; Thompson, 2020; Scheidl et al., 2023a;

Nathanielsz et al., 2013; Mazzucco et al., 2013a; Heinecke et al., 2020), evidenciando la programación metabólica de anomalías en el feto relacionadas a la EHGNA. Se observó que la trigliceridemia fetal puede tanto aumentar (Mazzucco et al., 2013b; Díaz et al., 2015) como disminuir en modelos de sobrepeso y de diabetes gestacional (Balachandiran et al., 2021; Shook et al., 2023). Si bien no están claros los mecanismos subyacentes de regulación de la trigliceridemia fetal en el contexto de obesidad materna, en ambos casos se promueve la acumulación de lípidos en tejidos fetales (Brumbaugh and Friedman, 2014).

Los hígados fetales indistintamente del sexo del grupo DG, mostraron sobreacumulación lipídica. Aun así, a nivel molecular, encontramos algunas diferencias dependientes del sexo en la expresión génica, evidenciando en las hembras niveles elevados de ARN mensajero de *Srebp-1c*, *Cyp4a1* y *Sod2*, mientras que en los machos solo se observó un incremento en los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c*. Estos genes están involucrados en la EHGNA, mediante alteraciones en la síntesis de lípidos, oxidación de ácidos grasos y la función antioxidante, contribuyendo a la acumulación de lípidos y al estrés oxidativo (Alfaradhi et al., 2014; Wardani et al., 2019; Heinecke et al., 2020; Thompson, 2020). Se ha reportado una programación intrauterina de características similares a la enfermedad del hígado graso en los fetos por el sobrepeso materno, con alteraciones en el metabolismo lipídico y la respuesta frente al estrés oxidativo (Mazzucco et al., 2013a; Brumbaugh and Friedman, 2014; Alfaradhi et al., 2014; Lynch et al., 2017; Nirala et al., 2024). En trabajos previos y de otros autores se ha observado hiperinsulinemia en los fetos al día 21 de gestación en modelos de obesidad por dieta alta en grasas (Mazzucco et al., 2013a; Murabayashi et al., 2013; Catalano and Shankar, 2017). La sobreacumulación de lípidos fetales podría originarse en el incremento de *Srebp-1c*, que está ligado al accionar lipogénico de la insulina.

El tratamiento materno con butirato previno la sobreacumulación de lípidos en el hígado fetal, de manera más marcada en los fetos macho, en los que normalizó la trigliceridemia. Además, en el grupo DGB, el butirato previno el incremento en los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c*, *Cyp4a1* y *Sod2* en hembras, aunque los niveles elevados de *Srebp-1c* se acentuaron en machos. Parecería que el butirato tiene efectos convergentes en cuanto a la prevención de la acumulación lipídica hepática, aunque por diferentes vías de acuerdo al sexo. Dado que en las hembras la trigliceridemia no se normaliza, los efectos sobre el hígado fetal podrían estar vinculados a efectos directos del

butirato sobre la expresión de genes y proteínas del transporte de lípidos en el hígado. De manera diferente, en los machos, la normalización del contenido de lípidos hepático podría estar vinculado a la normalización de la trigliceridemia y a la modulación placentaria del transporte de lípidos. En línea con nuestros resultados, modelos de gestantes con sobrepeso a las que se les administra butirato, se ha observado un aumento en la capacidad antioxidante en el hígado fetal (Lin et al., 2014) y prevención de las alteraciones en la acumulación y en el metabolismo de lípidos en el hígado fetal (Li et al., 2013b; Huang et al., 2022), denotando un efecto beneficioso del AGCC durante la gestación.

A pesar de las diferencias dependientes del sexo tanto en la placenta como en el feto, se evidencia un pasaje mayor de nutrientes en el grupo DG junto con marcadores de hígado graso, y una mejora en el programa metabólico por el tratamiento con butirato, lo que podría prevenir el desarrollo de alteraciones y patologías metabólicas en el futuro. *Con estos resultados podemos decir que el butirato parece tener un potencial preventivo en la programación metabólica adversa en fetos expuestos a un entorno materno obesógeno, lo que podría reducir el riesgo de desarrollar patologías metabólicas en la adultez.*

A continuación, discutiremos el efecto de la administración de butirato durante la preñez y la lactancia a ratas con obesidad y a su descendencia a los 140 días de vida.

La lactancia, al igual que la gestación y la primera infancia, son momentos cruciales para el desarrollo de las crías en crecimiento. Por ello, un desafío nutricional durante los mismos influye en la salud de la descendencia a lo largo de toda su vida (Picó et al., 2021). Distintos trabajos muestran que la exposición a dietas altas en grasa durante la gestación y/o la lactancia programa alteraciones metabólicas, asociadas a la obesidad materna, generando alteraciones en la descendencia a lo largo de su vida (Gregorio et al., 2010; Tsuduki et al., 2013; C. Reynolds et al., 2015; Lindsay et al., 2019; Álvarez et al., 2020; Picó et al., 2021).

Con el objetivo de evaluar el efecto de la dieta rica en grasas saturadas y el tratamiento materno con butirato sobre el desarrollo y crecimiento de la descendencia en su adultez, decidimos seguir el modelo explicado en el capítulo 1 hasta los 140 días de vida de la descendencia. Para esto, se dejó nacer a las crías y durante la lactancia se continuó alimentando a las madres con sus respectivas dietas. Durante la lactancia, la

madre experimenta una hiperfagia similar a la gestación. Sin embargo, tanto las reservas, como gran parte de la ingesta son dirigidas a la glándula mamaria para ser parte de la producción de leche y así poder sustentar el crecimiento del neonato. Por ello, es que la hiperfagia materna no se acompaña con un incremento de peso. Por el contrario, se produce una disminución del peso materno. De acuerdo a esto, se disminuyó la cantidad de butirato a administrar a 1% y se disminuyó la frecuencia, ya que calculado en función de la ingesta como se hizo durante la gestación, sería un incremento sustancial en la incorporación del ácido graso de cadena corta con respecto al peso corporal.

Los AGCC cumplen un rol importante en la lactancia, ya que la leche materna contiene AGCC que son transportados al neonato para su correcta nutrición y protección contra alergias alimenticias (Paparo et al., 2021). La obesidad materna está asociada a menores concentraciones de AGCC producido por la microbiota intestinal, por ende en el momento de la lactancia, la leche materna también podría presentar menos concentración de AGCC. La leche materna proporciona un suministro inicial de AGCC al recién nacido, cuando la producción endógena por su microbiota inmadura es baja. Se ha observado que la presencia de AGCC está asociado a la mejora en la composición corporal de grasa en la descendencia (Prentice et al., 2019; He et al., 2023).

A pesar de no realizar una cuantificación, observamos que las madres DG se comportaban de distinta manera durante la lactancia. En primer lugar, no construían el nido como lo realizaban las madres CT, sino que lo hacían de manera desordenada, en varios lugares y, además, se comían el papel proporcionado para el armado del nido. Luego de parir, aislaban a sus crías en diferentes sitios del lecho, de acuerdo a los varios sitios donde habían dejado nidos a medio construir. La administración de butirato previno parcialmente ese comportamiento, las madres del grupo DGB no se comían el papel y organizaban mejor el nido, aunque no llegaba a estar tan armado como el de las controles. Se ha asociado a la obesidad con menores probabilidades de realizar una lactancia materna exitosa, con una reducción en el primer contacto piel a piel, en el éxito de lactancia materna en la primera hora, de lactancia materna exclusiva y de la voluntad de la misma, junto con un mayor riesgo de retraso en la lactogénesis (Lepe et al., 2011; Ballesta-Castillejos et al., 2020).

Luego del destete evaluamos la condición metabólica de las madres y cómo se afectaba la misma luego de los períodos de gestación y lactancia por la dieta con exceso

de grasas saturadas sola o junto con el tratamiento con butirato. Previamente, describimos las alteraciones de las ratas con obesidad al día 21 de gestación. Asimismo, establecimos que, si bien el butirato prevenía alteraciones importantes en los fetos de 21 días de gestación, no prevenía algunas de las alteraciones maternas. Más aún, el contenido lipídico hepático se acentuaba. De acuerdo con estas observaciones, se continuó el estudio de las madres al destete.

Observamos que, al final de la lactancia, aunque las madres del grupo DG no mostraron diferencias significativas en el peso corporal al momento de la eutanasia, sí presentaron un incremento en el peso relativo del tejido adiposo. Este hallazgo es coherente con estudios previos que vinculan el sobrepeso materno con alteraciones en la composición corporal de grasa, lo que podría predisponer a las madres a desarrollar otras patologías metabólicas más adelante en la vida (Ghibaudi et al., 2002; Hariri and Thibault, 2010; De Moura E Dias et al., 2021). Además, el incremento de los niveles de las enzimas ALT y ALP, de la citoquina proinflamatoria IL-1 β , junto con la acumulación de lípidos y el aumento de la lipoperoxidación en el hígado, son indicativos de daño hepático y la presencia de esteatosis hepática (Henao-Mejia et al., 2012; Pafili and Roden, 2021; Habibullah et al., 2024). La literatura sostiene que la obesidad y el sobrepeso materno están asociados con un mayor riesgo de desarrollar EHGNA, tanto en humanos como en modelos animales, debido a la sobreacumulación de lípidos hepáticos y el estrés oxidativo generado (Wardani et al., 2019; Lian et al., 2020; Eng and Estall, 2021; Scorletti and Carr, 2022).

El tratamiento con butirato durante la gestación y lactancia demostró efectos preventivos sobre algunas de las alteraciones observadas. Específicamente, se previno el incremento en el peso del tejido adiposo, de la actividad de ALT, de los niveles de IL-1 β y la lipoperoxidación hepática, y se observó una disminución en la actividad de AST y en la trigliceridemia. Por otro lado, en esta etapa, a diferencia de la gestación a término, no se observó que el tratamiento con butirato acentuara la acumulación lipídica hepática en las madres con obesidad. Estos resultados son prometedores, ya que sugieren un efecto protector del butirato frente a la disfunción metabólica inducida por una dieta rica en grasas saturadas durante el embarazo y la lactancia. En este trabajo administramos butirato durante los desafíos metabólicos de la gestación y la lactancia, momentos en los que hay una demanda alta de nutrientes que deben ser direccionados de manera específica. Es por ello que los resultados acá presentados son diferentes a los obtenidos por otros

grupos que utilizan modelos en momentos que no son ni la preñez ni la lactancia. En efecto, otros han descrito el rol del butirato en ausencia de dichos desafíos metabólicos, y no se ha descrito un incremento de los lípidos hepáticos (Sun et al., 2018, 2019; Zhang et al., 2021; Serena Coppola et al., 2021; Mayorga-Ramos et al., 2022). Durante la lactancia y la preñez, la fisiología materna se adapta, y, con ayuda de la función placentaria y de la glándula mamaria, el feto y el neonato se desarrollan, nutren y crecen de manera adecuada. La función placentaria ha sido discutida, sus alteraciones por la obesidad materna, así como los efectos del tratamiento con butirato. *Será de sumo interés en trabajos futuros evaluar cómo afecta el butirato la función de la glándula mamaria y así la lactancia.*

Junto con la acumulación lipídica hepática en las madres al destete, en los grupos DG y DGB se observó un incremento en los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c*, un factor de transcripción clave en la lipogénesis. La disminución de las enzimas *Fasn*, *Acc1* y *Fabp5*, involucradas en la síntesis y transporte interno de ácidos grasos, sugiere una posible regulación compensatoria en respuesta a la acumulación excesiva de lípidos en ambos grupos de dieta grasa. El aumento en los niveles de *Acaa2*, una enzima clave en la β -oxidación de ácidos grasos, refuerza la hipótesis de que el hígado podría intentar contrarrestar la sobrecarga lipídica mediante la oxidación de ácidos grasos tanto en el grupo DG como DGB. Si bien observamos que las ratas con sobrepeso luego de la lactancia presentaban múltiples alteraciones metabólicas clínicas que fueron prevenidas en parte por el tratamiento con butirato, no se evidenció un correlato de esta prevención en los niveles de ARN mensajero de enzimas claves del metabolismo lipídico. Aun así, la salud metabólica materna luego del destete del grupo DGB se encuentra en mejores condiciones que el grupo DG y que las gestantes a término del grupo DGB.

Como se ha mencionado, el butirato disminuyó la trigliceridemia y la adiposidad en las madres con obesidad al final de la lactancia. Nos alarmó que esto coincidiera con una disminución del peso corporal de las crías al momento del destete, ya que un retraso de crecimiento en etapas tempranas del desarrollo podría ser un indicador de programación de alteraciones metabólicas futuras. Por ello, se realizó un seguimiento del peso de la descendencia desde el destete hasta los 140 días de vida y no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la dinámica de crecimiento, pero si encontramos que a los 140 días tanto las hembras como los machos no presentaban diferencias de peso debido a la obesidad materna. Sin embargo, la descendencia macho de madres con

obesidad y que recibieron butirato durante la gestación y lactancia, presentaba el peso, el contorno y la adiposidad disminuidos mientras que la longitud se mantenía similar a los otros dos grupos. Esto indicaría que el butirato induce una disminución en la masa grasa, reflejada en el contorno y el peso que no afectaría la masa magra de los individuos. La disminución del componente graso de la masa corporal, lejos de ser alarmante, parece tener buen pronóstico metabólico (Claiborne et al., 2024). En cuanto a las hembras, la obesidad materna indujo una tendencia al incremento en la adiposidad que no se observa en la descendencia de madres con obesidad que recibió butirato. Este cambio en la adiposidad que, al igual que en los machos se vincula con una disminución en el contorno, no se asocia en este caso a una disminución de peso, lo que igualmente podría ser indicador de una mejora en el programa metabólico de la descendencia de rata con obesidad.

Luego de la lactancia, la descendencia de todos los grupos experimentales fue alimentada con alimento normograso hasta su eutanasia a los 140 días de edad. Como hemos mencionado, observamos que la descendencia del grupo DG no presentó diferencias significativas en el peso corporal ni en los niveles de lípidos circulantes al compararlo con el control. Aunque sí observamos, al igual que previamente (Mazzucco et al., 2016; Heinecke et al., 2020), una sobreacumulación lipídica hepática, daño hepático relacionados con especies reactivas del oxígeno y un incremento en los niveles de transaminasas en la descendencia del grupo DG, lo que indica daño hepático. Estos resultados fueron observados por nosotros y otros grupos de investigación (Gregorio et al., 2010; Lynch et al., 2017; Mazzucco et al., 2016; Thompson, 2020; Heinecke et al., 2020; Eng and Estall, 2021). *Es interesante remarcar la importancia de estos resultados ya que, tanto en modelos animales como en humanos, trastornos metabólicos de importancia podrían ser subestimados con las evaluaciones clínicas habituales. Este trabajo sugiere la importancia de indagar en la historia metabólica familiar al momento de la indicación de exámenes de rutina.*

La administración materna de butirato durante la gestación y la lactancia con obesidad tiene un impacto positivo en la descendencia a los 140 días. Previene la sobreacumulación lipídica hepática, el daño por especies reactivas del oxígeno y en los machos el incremento de transaminasas, lo que podría mejorar el programa metabólico del hígado.

La obesidad materna induce alteraciones en la descendencia y el butirato las previene de manera independiente del sexo. Por el contrario, el correlato molecular en cuanto a la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico hepático es más complejo y presenta diferencias dependientes del sexo. La obesidad materna en la descendencia hembra incrementa los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c*, *Lxra* y *Acc1*, genes involucrados en la síntesis de lípidos. El factor de transcripción *Lxra* induce la transcripción del factor *Srebp-1c*, el cual a su vez induce la expresión de *Acc1* (Chandrasekaran and Weiskirchen, 2024). Estos incrementos contrastarían con la disminución del contenido hepático de ácidos grasos libres. Sin embargo, de acuerdo a los efectos de *Srebp-1c*, los ácidos grasos libres podrían disminuir, pero para pasar a ser sustrato de esterificación y pasar a formar parte del incremento del contenido de triglicéridos hepáticos observados. Se ha reportado un incremento en la expresión de estos genes coincidente con el incremento en el contenido lipídico hepático en modelos de EHGNA (Chen et al., 2009; Harriman et al., 2016; Chandrasekaran and Weiskirchen, 2024). Asimismo, se encontró un incremento en los niveles de ARN mensajero de *Acca2*, *Cyp4a1* y *Nrlp3*, involucrados en la respuesta inflamatoria y oxidativa que se encuentra también en modelos de sobrepeso y/o enfermedad de hígado graso de distintos grados de severidad (Henao-Mejia et al., 2012; Zhang et al., 2017; Chalasani et al., 2018; Heinecke et al., 2020). En las hembras del grupo DGB, no se observan los incrementos en la expresión de los genes antes mencionados. Las variaciones en los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c* y *Lxra* son coincidentes como era esperable, dado que ambos actúan como sensores de colesterol y son activados mediante oxisteroles (Repa et al., 2002; Sato, 2010; Bovenga et al., 2015; Palmisano et al., 2018). La normalización de los niveles de los genes involucrados en el metabolismo de lípidos y la respuesta inflamatoria y oxidativa podría estar vinculada a la del contenido lipídico hepático y a la prevención de las anomalías en el programa metabólico en el hígado.

En el caso de la descendencia macho, encontramos que la obesidad materna induce un incremento de los niveles de ARN mensajero de *Cyp4a1* y de *Il-18*, claros marcadores de una respuesta inflamatoria y oxidativa, que se encuentra frecuentemente en los modelos de hígado graso (Henao-Mejia et al., 2012; Zhang et al., 2017; Chalasani et al., 2018). Ambas alteraciones no se observan en el grupo DGB. De manera inesperada, los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c* fueron disminuidos en la descendencia macho de los grupos DG y DGB. Esta alteración, en el contexto de la sobreacumulación lipídica

encontrada en el grupo DG, es inusual y llama la atención, no sólo por el contexto de hígado graso, sino por la diferencia con las hembras. Más aún, en etapas más tempranas, los fetos macho presentan un incremento en los niveles de ARN mensajero de *Srebp-1c*. Podría ser una respuesta adaptativa al incremento en el contenido de lípidos o podría ser causa de una disminución en la sensibilidad tisular hepática a la insulina, que no se ha evaluado en este trabajo. En todo caso, parece responder a la historia de obesidad materna más que al contexto hepático propio, ya que en el caso de la descendencia del grupo DGB, en la que el contenido lipídico hepático es semejante al control, también se encontraron disminuidos.

Las diferencias dependientes del sexo en *Srebp-1c* podrían atribuirse a las diferencias en los niveles de *Lxra* mencionadas. Además de las variaciones en los niveles observadas solo en hembras, diferencias dependientes del metabolismo del colesterol entre machos y hembras podrían ser las causantes de las diferentes respuestas a ambientes metabólicos similares (Repa et al., 2002; Sato, 2010; Bovenga et al., 2015; Palmisano et al., 2018).

De cualquier manera, más allá de poder comprender del todo el contexto molecular en cuanto a los niveles de ARN mensajero de los genes en estudio, observamos que la obesidad materna programa alteraciones hepáticas compatibles con EHGNA, que el tratamiento con butirato previene con algunas diferencias dependientes del sexo, pero que globalmente prevendrían el desarrollo de dicha patología.

Por otro lado, se detectaron alteraciones en los parámetros reproductivos de la descendencia DG, con una mayor duración del ciclo estral en hembras y un mayor índice testicular y menor motilidad espermática en machos, alteraciones que no se observan en la descendencia del grupo DGB. Estos resultados son consistentes con estudios que demuestran que el entorno intrauterino adverso puede afectar el desarrollo reproductivo de la descendencia (Yao et al., 2021; Meneghini et al., 2022, 2024) y sugieren un rol protector del butirato de dicha función.

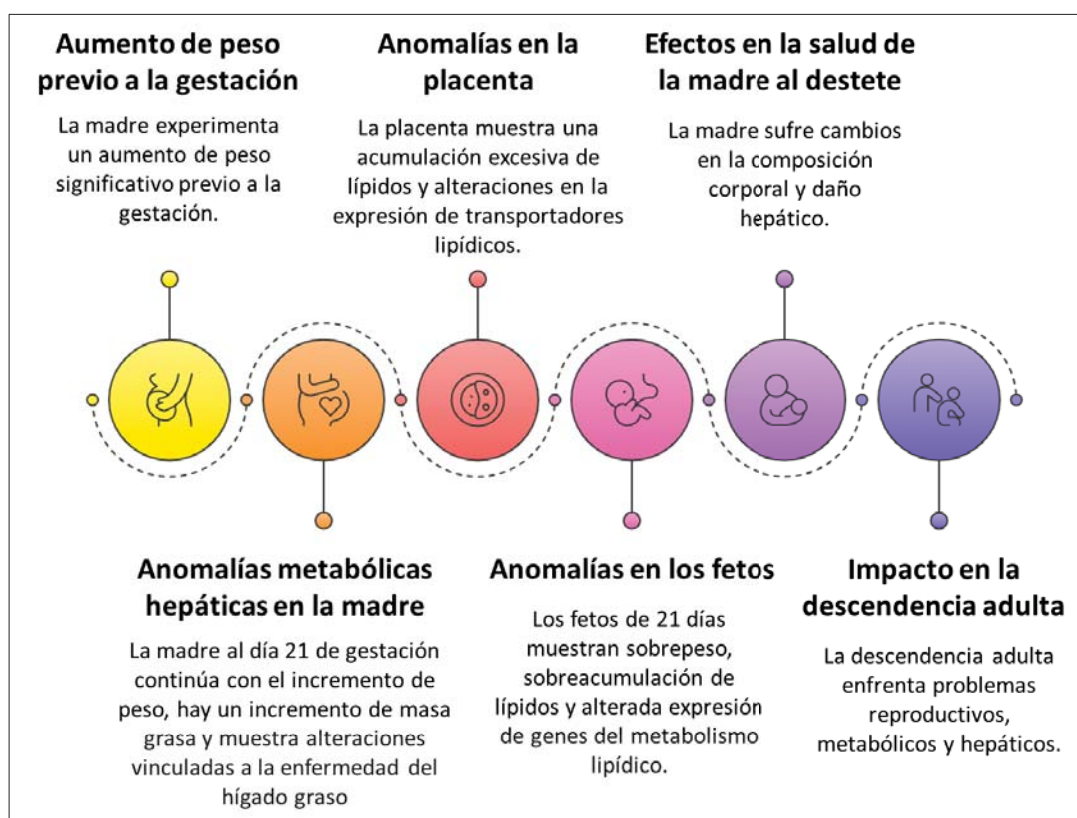
El tratamiento con butirato fue capaz de mejorar las alteraciones programadas por la obesidad materna en la descendencia, previniendo la mayor predisposición a desarrollar algún desorden metabólico y disfunción reproductiva en su vida adulta. Investigaciones futuras son necesarias para entender los mecanismos subyacentes.

6. CONCLUSIÓN

CONCLUSIÓN

Con respecto a nuestra hipótesis de trabajo “*El sobrepeso materno induce alteraciones en el metabolismo y en la salud hepática de la rata gestante, que programan anomalías metabólicas, reproductivas y hepáticas en la descendencia, que se atenúan por el tratamiento materno con butirato*”, podemos decir que nuestros resultados la respaldan.

A continuación, se muestra una esquematización y un punteo de lo observado en la presente tesis:

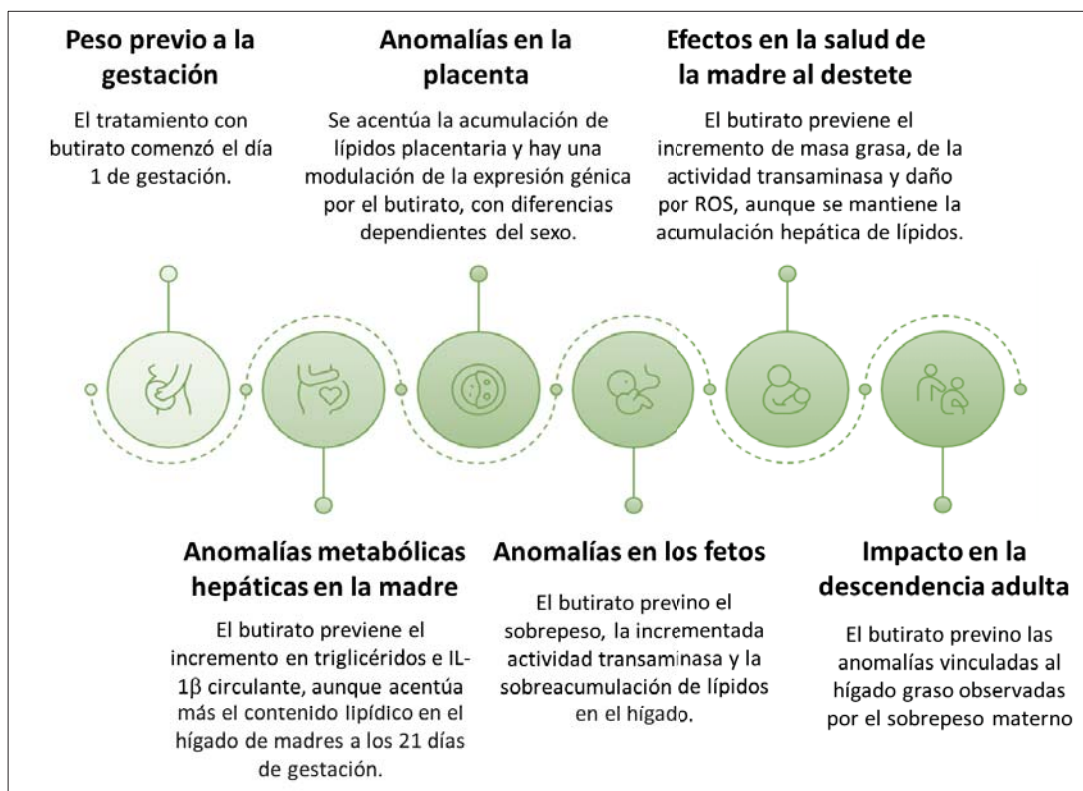


Esquema 12: Representación gráfica del efecto de la dieta rica en grasas saturadas en la salud de la madre y la descendencia.

- En la madre al día 21 de gestación, la dieta rica en grasas saturadas genera un sobrepeso, incremento en la adiposidad y alteraciones características de la enfermedad del hígado graso.

- Las placentas a los 21 días de gestación presentaron menor peso, sobreacumulación de lípidos y alteraciones dependientes del sexo en la expresión de genes y proteínas clave del transporte y metabolismo lipídico, pudiendo alterar el pasaje de nutrientes y sustancias al feto en desarrollo.
- Los fetos de 21 días de gestación presentaron un sobrepeso, incremento en la actividad transaminasa, disminución en la trigliceridemia, sobreacumulación hepática de lípidos y alterada expresión génica dependiente del sexo de genes involucrados en el metabolismo de lípidos en el hígado, evidenciando una programación intrauterina de alteraciones metabólicas.
- Luego del destete las ratas presentaron alteraciones en la composición corporal de grasa y marcadores de daño hepático y alterada expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico hepático.
- La descendencia adulta de estas ratas, a pesar de alimentarse con una dieta normograsa a partir del destete, presentó alteraciones en parámetros reproductivos, en la composición corporal de grasa, marcadores de daño hepático y alteraciones dependientes del sexo en la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico hepático. Esto evidencia el impacto de un ambiente materno alterado y su efecto sobre la programación de alteraciones metabólicas en la descendencia a lo largo de su vida.

A continuación, se muestra una esquematización y un punteo del efecto del tratamiento materno con butirato:



Esquema 13: Representación gráfica del efecto del tratamiento materno con butirato en la salud de la madre y la descendencia.

- ✓ Observamos que la administración de butirato no tuvo efectos nocivos en la gestante, placenta y feto del grupo CT.
- ✓ La administración de butirato durante la gestación a ratas con obesidad, si bien no mejoró la salud hepática, normalizó los niveles de triglicéridos e IL-1 β circulantes de la gestante.
- ✓ Además, dicho tratamiento tuvo efectos dependientes del sexo en la placenta. En conjunto, los cambios placentarios y las mejoras maternas resultaron en claros efectos protectores en el feto de 21 días de gestación, lo que podría mejorar el programa metabólico de la descendencia.
- ✓ Cuando el tratamiento con butirato se administró durante la gestación y la lactancia, observamos una mejora en las ratas luego del destete, con una reducción del peso del tejido adiposo y modulación de la expresión génica hepática, probablemente vinculada a la disminución del daño hepático.
- ✓ La descendencia adulta presentó claras mejoras en cuanto a los parámetros reproductivos. Atenuó, si bien con diferencias entre machos y hembra, el daño hepático y la expresión alterada de genes involucrados en el desarrollo de la

EHGNA, lo que refuerza lo observado en fetos y sugiere que el tratamiento materno con butirato mejora el programa metabólico en la descendencia de rata con obesidad.

En la presente tesis se evidencian alteraciones metabólicas que no son en todos los casos acompañados por un incremento del peso corporal. Esto subraya las limitaciones que presenta el indicador IMC como criterio de salud metabólica. Por otro lado, obtuvimos resultados prometedores mediante el tratamiento con butirato a las madres con obesidad. Dicho tratamiento mejora el programa metabólico de la descendencia, y nos remarca no sólo la importancia del diseño de intervenciones durante el desarrollo, sino de mantener una apropiada nutrición de manera previa, durante y luego del embarazo, para la salud materna y la de la descendencia. El suministro de butirato durante la gestación y lactancia parece ser una terapia prometedora para mejorar la salud metabólica de la descendencia. Sin embargo, se requieren más estudios para entender completamente los mecanismos subyacentes y para optimizar el uso de butirato como terapia preventiva.

7. REFERENCIAS

- Abdel-Misih, S.R.Z., Bloomston, M., 2010. Liver Anatomy. *Surg. Clin. North Am.* 90, 643–653. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>
- Alfaradhi, M.Z., Fernandez-Twinn, D.S., Martin-Gronert, M.S., Musial, B., Fowden, A., Ozanne, S.E., 2014. Oxidative stress and altered lipid homeostasis in the programming of offspring fatty liver by maternal obesity. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307, R26–R34. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00049.2014>
- Álvarez, D., Muñoz, Y., Ortiz, M., Maliqueo, M., Chouinard-Watkins, R., Valenzuela, R., 2020. Impact of Maternal Obesity on the Metabolism and Bioavailability of Polyunsaturated Fatty Acids during Pregnancy and Breastfeeding. *Nutrients* 13, 19. <https://doi.org/10.3390/nu13010019>
- Alvaro, A., Solà, R., Rosales, R., Ribalta, J., Anguera, A., Masana, L., Vallvé, J.C., 2008. Gene expression analysis of a human enterocyte cell line reveals downregulation of cholesterol biosynthesis in response to short-chain fatty acids. *IUBMB Life* 60, 757–764. <https://doi.org/10.1002/iub.110>
- Alves-Bezerra, M., Cohen, D.E., 2017. Triglyceride Metabolism in the Liver, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. Wiley, pp. 1–22. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>
- Anachad, O., Taouil, A., Taha, W., Bennis, F., Chegdani, F., 2023. The Implication of Short-Chain Fatty Acids in Obesity and Diabetes. *Microbiol. Insights* 16, 117863612311627. <https://doi.org/10.1177/11786361231162720>
- Balachandiran, M., Bobby, Z., Dorairajan, G., Jacob, S.E., Gladwin, V., Vinayagam, V., Packirisamy, R.M., 2021. Placental Accumulation of Triacylglycerols in Gestational Diabetes Mellitus and Its Association with Altered Fetal Growth are Related to the Differential Expressions of Proteins of Lipid Metabolism. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 129, 803–812. <https://doi.org/10.1055/a-1017-3182>
- Ballesta-Castillejos, A., Gomez-Salgado, J., Rodriguez-Almagro, J., Ortiz-Esquinas, I., Hernandez-Martinez, A., 2020. Relationship between maternal body mass index with the onset of breastfeeding and its associated problems: an online survey. *Int. Breastfeed. J.* 15, 55. <https://doi.org/10.1186/s13006-020-00298-5>
- Banasiewicz, T., Domagalska, D., Borycka-Kiciak, K., Rydzewska, G., 2020. Determination of butyric acid dosage based on clinical and experimental studies – a literature review. *Gastroenterol. Rev.* 15, 119–125. <https://doi.org/10.5114/pg.2020.95556>
- Bandres-Meriz, J., Dieberger, A.M., Hoch, D., Pöchlauer, C., Bachbauer, M., Glasner, A., Niedrist, T., van Poppel, M.N.M., Desoye, G., 2020. Maternal Obesity Affects the Glucose-Insulin Axis During the First Trimester of Human Pregnancy. *Front. Endocrinol.* 11, 566673. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.566673>
- Bandres-Meriz, J., Kunz, C., Havelund, J.F., Færgeman, N.J., Majali-Martinez, A., Ensenauer, R., Desoye, G., 2023. Distinct maternal metabolites are associated with obesity and glucose-insulin axis in the first trimester of pregnancy. *Int. J. Obes.* 47, 529–537. <https://doi.org/10.1038/s41366-023-01295-4>
- Barker, D., 1986. INFANT MORTALITY, CHILDHOOD NUTRITION, AND ISCHAEMIC HEART DISEASE IN ENGLAND AND WALES. *The Lancet* 327, 1077–1081. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)91340-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)91340-1)
- Barker, D.J., Gluckman, P.D., Godfrey, K.M., Harding, J.E., Owens, J.A., Robinson, J.S., 1993. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet Lond. Engl.* 341, 938–941. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)91224-a](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)91224-a)
- Barker, D.J.P., 2007. The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 261, 412–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x>
- Barker, D.J.P., Osmond, C., Winter, P.D., Margetts, B., Simmonds, S.J., 1989. WEIGHT IN INFANCY AND DEATH FROM ISCHAEMIC HEART DISEASE. *The Lancet* 334, 577–580. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)90710-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(89)90710-1)
- Barrett, H.L., Kubala, M.H., Scholz Romero, K., Denny, K.J., Woodruff, T.M., McIntyre, H.D., Callaway, L.K., Nitert, M.D., 2014. Placental Lipases in Pregnancies Complicated by

- Gestational Diabetes Mellitus (GDM). *PLoS ONE* 9, e104826.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104826>
- Bazzano, M.V., Sarrible, G.B., Berón De Astrada, M., Elia, E., 2021. Obesity modifies the implantation window and disrupts intrauterine embryo positioning in rats. *Reproduction* 162, 61–72. <https://doi.org/10.1530/REP-21-0015>
- Bellisario, V., Panetta, P., Balsevich, G., Baumann, V., Noble, J., Raggi, C., Nathan, O., Berry, A., Seckl, J., Schmidt, M., Holmes, M., Cirulli, F., 2015. Maternal high-fat diet acts as a stressor increasing maternal glucocorticoids' signaling to the fetus and disrupting maternal behavior and brain activation in C57BL/6J mice. *Psychoneuroendocrinology* 60, 138–150. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.06.012>
- Ben M'barek, K., Ajjaji, D., Chorlay, A., Vanni, S., Forêt, L., Thiam, A.R., 2017. ER Membrane Phospholipids and Surface Tension Control Cellular Lipid Droplet Formation. *Dev. Cell* 41, 591-604.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.05.012>
- Beneventi, F., Bellingeri, C., De Maggio, I., Spada, C., Pandolfi, M.P., Smaghi, A.B., Cortese, M., Ligari, E., Alpini, C., Spinillo, A., 2025. Maternal and Cord Blood Lipids in Pregnant Women With Obesity and Their Impact on Neonatal and Placental Biometric Features. *Obes. Sci. Pract.* 11, e70053. <https://doi.org/10.1002/osp4.70053>
- Bildirici, I., Schaiff, W.T., Chen, B., Morizane, M., Oh, S.-Y., O'Brien, M., Sonnenberg-Hirche, C., Chu, T., Barak, Y., Nelson, D.M., Sadovsky, Y., 2018. PLIN2 Is Essential for Trophoblastic Lipid Droplet Accumulation and Cell Survival During Hypoxia. *Endocrinology* 159, 3937–3949. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00752>
- Blüher, M., 2019. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* 15, 288–298. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>
- Boets, E., Gomand, S.V., Deroover, L., Preston, T., Vermeulen, K., De Preter, V., Hamer, H.M., Van Den Mooter, G., De Vuyst, L., Courtin, C.M., Annaert, P., Delcour, J.A., Verbeke, K.A., 2017. Systemic availability and metabolism of colonic-derived short-chain fatty acids in healthy subjects: a stable isotope study. *J. Physiol.* 595, 541–555. <https://doi.org/10.1113/JP272613>
- Bondia-Pons, I., Ryan, L., Martinez, J.A., 2012. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J. Physiol. Biochem.* 68, 701–711. <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0154-2>
- Bovenga, F., Sabbà, C., Moschetta, A., 2015. Uncoupling Nuclear Receptor LXR and Cholesterol Metabolism in Cancer. *Cell Metab.* 21, 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.03.002>
- Bradbury, M.W., 2006. Lipid Metabolism and Liver Inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G194–G198. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00413.2005>
- Bray, G.A., 2004. Medical Consequences of Obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2583–2589. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0535>
- Brown, A.J., Goldsworthy, S.M., Barnes, A.A., Eilert, M.M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A.I., Wigglesworth, M.J., Kinghorn, I., Fraser, N.J., Pike, N.B., Strum, J.C., Steplewski, K.M., Murdock, P.R., Holder, J.C., Marshall, F.H., Szekeres, P.G., Wilson, S., Ignar, D.M., Foord, S.M., Wise, A., Dowell, S.J., 2003. The Orphan G Protein-coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids. *J. Biol. Chem.* 278, 11312–11319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211609200>
- Brumbaugh, D.E., Friedman, J.E., 2014. Developmental origins of nonalcoholic fatty liver disease. *Pediatr. Res.* 75, 140–147. <https://doi.org/10.1038/pr.2013.193>
- Burd, L., Roberts, D., Olson, M., Odendaal, H., 2007. Ethanol and the placenta: A review. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 20, 361–375. <https://doi.org/10.1080/14767050701298365>
- Buse, K., Ralston, J., Barquera, S., 2024. Let's talk differently about obesity. *BMJ* q537. <https://doi.org/10.1136/bmj.q537>

- Calabuig-Navarro, V., Haghiac, M., Minium, J., Glazebrook, P., Ranasinghe, G.C., Hoppel, C., Hauguel de-Mouzou, S., Catalano, P., O'Tierney-Ginn, P., 2017. Effect of Maternal Obesity on Placental Lipid Metabolism. *Endocrinology* 158, 2543–2555. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00152>
- Canbay, A., Bechmann, L., Gerken, G., 2007. Lipid Metabolism in the Liver. *Z. Für Gastroenterol.* 45, 35–41. <https://doi.org/10.1055/s-2006-927368>
- Carmody, R.N., Gerber, G.K., Luevano, J.M., Gatti, D.M., Somes, L., Svenson, K.L., Turnbaugh, P.J., 2015. Diet Dominates Host Genotype in Shaping the Murine Gut Microbiota. *Cell Host Microbe* 17, 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.010>
- Carpenter, K., Strohacker, K., McFarlin, B., 2013. Considerations to maximize fat mass gain in a mouse model of diet-induced weight gain. *Lab. Anim.* 47, 266–273. <https://doi.org/10.1177/0023677213501658>
- Catalano, P.M., Shankar, K., 2017. Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. *BMJ* j1. <https://doi.org/10.1136/bmj.j1>
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J.E., Charlton, M., Cusi, K., Rinella, M., Harrison, S.A., Brunt, E.M., Sanyal, A.J., 2018. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases: *Hepatology*, Vol. XX, No. X, 2017. *Hepatology* 67, 328–357. <https://doi.org/10.1002/hep.29367>
- Chandrasekaran, P., Weiskirchen, R., 2024. The Role of SCAP/SREBP as Central Regulators of Lipid Metabolism in Hepatic Steatosis. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 1109. <https://doi.org/10.3390/ijms25021109>
- Chavan-Gautam, P., Rani, A., Freeman, D.J., 2018. Distribution of Fatty Acids and Lipids During Pregnancy, in: *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 209–239. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2017.12.006>
- Chen, H., Tan, H., Wan, J., Zeng, Y., Wang, J., Wang, H., Lu, X., 2023. PPAR- γ signaling in nonalcoholic fatty liver disease: Pathogenesis and therapeutic targets. *Pharmacol. Ther.* 245, 108391. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108391>
- Chen, J., Zheng, R.-D., Xu, C.-R., Wu, W.-P., 2009. [Expression and significance of liver X receptor-alpha in nonalcoholic fatty liver disease in rats]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Xue Za Zhi Zhonghua Shiyen He Linchuang Bingduxue Zazhi Chin. J. Exp. Clin. Virol.* 23, 265–268.
- Claiborne, A., Jevtic, F., Zheng, D., Strom, C., Wisseman, B., McDonald, S., Newton, E., Mouro, S., DeVente, J., Houmard, J.A., Broskey, N.T., May, L.E., 2024. Exercise during pregnancy modulates infant cellular and whole-body adiposity. *Physiol. Rep.* 12, e70145. <https://doi.org/10.14814/phy2.70145>
- Cleophas, M.C.P., Ratter, J.M., Bekkering, S., Quintin, J., Schraa, K., Stroes, E.S., Netea, M.G., Joosten, L.A.B., 2019. Effects of oral butyrate supplementation on inflammatory potential of circulating peripheral blood mononuclear cells in healthy and obese males. *Sci. Rep.* 9, 775. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37246-7>
- Clifton, V.L., 2010. Review: Sex and the Human Placenta: Mediating Differential Strategies of Fetal Growth and Survival. *Placenta* 31, S33–S39. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.11.010>
- Coan, P.M., Vaughan, O.R., Sekita, Y., Finn, S.L., Burton, G.J., Constancia, M., Fowden, A.L., 2010. Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice: Undernutrition and placental phenotype. *J. Physiol.* 588, 527–538. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.181214>
- Conway, B., Rene, A., 2004. Obesity as a disease: no lightweight matter. *Obes. Rev.* 5, 145–151. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2004.00144.x>

- Coppola, Serena, Avagliano, C., Calignano, A., Berni Canani, R., 2021. The Protective Role of Butyrate against Obesity and Obesity-Related Diseases. *Molecules* 26, 682. <https://doi.org/10.3390/molecules26030682>
- Coppola, S., Nocerino, R., Paparo, L., Di Scala, C., Voto, L., Luzzetti, A., Giglio, V., Berni Canani, R., 2021. Butyrate against paediatric obesity: results of the BAPO trial. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 31, 3249. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2021.08.003>
- Cora, M.C., Kooistra, L., Travlos, G., 2015. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol. Pathol.* 43, 776–793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
- Crunk, A.E., Monks, J., Murakami, A., Jackman, M., MacLean, P.S., Ladinsky, M., Bales, E.S., Cain, S., Orlicky, D.J., McManaman, J.L., 2013. Dynamic Regulation of Hepatic Lipid Droplet Properties by Diet. *PLoS ONE* 8, e67631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067631>
- Cusi, K., 2012. Role of Obesity and Lipotoxicity in the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis: Pathophysiology and Clinical Implications. *Gastroenterology* 142, 711–725.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.003>
- Dahlhoff, M., Pfister, S., Blutke, A., Rozman, J., Klingenspor, M., Deutsch, M.J., Rathkolb, B., Fink, B., Gimpfl, M., Hrabě De Angelis, M., Roscher, A.A., Wolf, E., Ensenauer, R., 2014. Peri-conceptual obesogenic exposure induces sex-specific programming of disease susceptibilities in adult mouse offspring. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1842, 304–317. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.021>
- De Moura E Dias, M., Dos Reis, S.A., Da Conceição, L.L., Sediya, C.M.N.D.O., Pereira, S.S., De Oliveira, L.L., Gouveia Peluzio, M.D.C., Martinez, J.A., Milagro, F.I., 2021. Diet-induced obesity in animal models: points to consider and influence on metabolic markers. *Diabetol. Metab. Syndr.* 13, 32. <https://doi.org/10.1186/s13098-021-00647-2>
- Demarquoy, J., 2015. Crosstalk between mitochondria and peroxisomes. *World J. Biol. Chem.* 6, 301. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i4.301>
- Den Besten, G., Bleeker, A., Gerding, A., Van Eunen, K., Havinga, R., Van Dijk, T.H., Oosterveer, M.H., Jonker, J.W., Groen, A.K., Reijngoud, D.-J., Bakker, B.M., 2015. Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet–Induced Obesity via a PPAR γ -Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. *Diabetes* 64, 2398–2408. <https://doi.org/10.2337/db14-1213>
- Desoye, G., Herrera, E., 2021. Adipose tissue development and lipid metabolism in the human fetus: The 2020 perspective focusing on maternal diabetes and obesity. *Prog. Lipid Res.* 81, 101082. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101082>
- Díaz, P., Harris, J., Rosario, F.J., Powell, T.L., Jansson, T., 2015. Increased placental fatty acid transporter 6 and binding protein 3 expression and fetal liver lipid accumulation in a mouse model of obesity in pregnancy. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 309, R1569–R1577. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00385.2015>
- Dimasuy, K.G., Boeuf, P., Powell, T.L., Jansson, T., 2016. Placental Responses to Changes in the Maternal Environment Determine Fetal Growth. *Front. Physiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00012>
- Doulberis, M., Papaefthymiou, A., Polyzos, S.A., Katsinelos, P., Grigoriadis, N., Srivastava, D.S., Kountouras, J., 2020. Rodent models of obesity. *Minerva Endocrinol.* 45. <https://doi.org/10.23736/S0391-1977.19.03058-X>
- Drake, A.J., Reynolds, R.M., 2010. Impact of maternal obesity on offspring obesity and cardiometabolic disease risk. *REPRODUCTION* 140, 387–398. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0077>
- Drake, A.J., Seckl, J.R., 2011. Transmission of programming effects across generations. *Pediatr. Endocrinol. Rev. PER* 9, 566–578.
- Du, Y., Li, X., Su, C., Xi, M., Zhang, X., Jiang, Z., Wang, L., Hong, B., 2020. Butyrate protects against high-fat diet-induced atherosclerosis via up-regulating ABCA1 expression in

- apolipoprotein E-deficiency mice. *Br. J. Pharmacol.* 177, 1754–1772.
<https://doi.org/10.1111/bph.14933>
- Dubé, E., Gravel, A., Martin, C., Desparois, G., Moussa, I., Ethier-Chiasson, M., Forest, J.-C., Giguère, Y., Masse, A., Lafond, J., 2012. Modulation of Fatty Acid Transport and Metabolism by Maternal Obesity in the Human Full-Term Placenta1. *Biol. Reprod.* 87.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.098095>
- Dupont, C., Cordier, A.G., Junien, C., Mandon-Pépin, B., Levy, R., Chavatte-Palmer, P., 2012. Maternal environment and the reproductive function of the offspring. *Theriogenology* 78, 1405–1414. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.016>
- Duttaroy, A.K., Basak, S., 2022. Maternal Fatty Acid Metabolism in Pregnancy and Its Consequences in the Feto-Placental Development. *Front. Physiol.* 12, 787848.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.787848>
- Eng, J.M., Estall, J.L., 2021. Diet-Induced Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Food for Thought on Sugar, Fat, and Cholesterol. *Cells* 10, 1805.
<https://doi.org/10.3390/cells10071805>
- Eriksson, J.G., Kajantie, E., Osmond, C., Thornburg, K., Barker, D.J.P., 2010. Boys live dangerously in the womb. *Am. J. Hum. Biol.* 22, 330–335.
<https://doi.org/10.1002/ajhb.20995>
- Fava, F., Rizzetto, L., Tuohy, K.M., 2019. Gut microbiota and health: connecting actors across the metabolic system. *Proc. Nutr. Soc.* 78, 177–188.
<https://doi.org/10.1017/S0029665118002719>
- Federici, M., Hribal, M., Perego, L., Ranalli, M., Caradonna, Z., Perego, C., Usellini, L., Nano, R., Bonini, P., Bertuzzi, F., Marlier, L.N.J.L., Davalli, A.M., Carandente, O., Pontiroli, A.E., Melino, G., Marchetti, P., Lauro, R., Sesti, G., Folli, F., 2001. High Glucose Causes Apoptosis in Cultured Human Pancreatic Islets of Langerhans. *Diabetes* 50, 1290–1301.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.50.6.1290>
- Férézou-Viala, J., Roy, A.-F., Sérougne, C., Grippo, D., Parquet, M., Bailleux, V., Gertler, A., Delplanque, B., Djiane, J., Riottot, M., Taouis, M., 2007. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R1056–R1062.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00117.2007>
- Fernandez-Twinn, D.S., Hjort, L., Novakovic, B., Ozanne, S.E., Saffery, R., 2019. Intrauterine programming of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 62, 1789–1801.
<https://doi.org/10.1007/s00125-019-4951-9>
- Ferreira, S.R.G., Macotela, Y., Velloso, L.A., Mori, M.A., 2024. Determinants of obesity in Latin America. *Nat. Metab.* 6, 409–432. <https://doi.org/10.1038/s42255-024-00977-1>
- Fitzgerald, E., Hor, K., Drake, A.J., 2020. Maternal influences on fetal brain development: The role of nutrition, infection and stress, and the potential for intergenerational consequences. *Early Hum. Dev.* 150, 105190.
<https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2020.105190>
- Fornes, D., Heinecke, F., Gatti, C.R., Roberti, S.L., White, V., Jawerbaum, A., Capobianco, E., 2022. Paternal diabetes programs sex-dependent placental alterations and fetal overgrowth. *J. Endocrinol.* 254, 37–49. <https://doi.org/10.1530/JOE-21-0301>
- Forsyth, I.A., 2009. Comparative aspects of placental lactogens: structure and function. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 102, 244–251. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1211288>
- Fowden, A.L., Camm, E.J., Sferruzzi-Perri, A.N., 2020. Effects of Maternal Obesity On Placental Phenotype. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 19, 113–131.
<https://doi.org/10.2174/1570161118666200513115316>
- Friedman, J.M., 2004. Modern science versus the stigma of obesity. *Nat. Med.* 10, 563–569.
<https://doi.org/10.1038/nm0604-563>

- Furukawa, S., Kuroda, Y., Sugiyama, A., 2014. A Comparison of the Histological Structure of the Placenta in Experimental Animals. *J. Toxicol. Pathol.* 27, 11–18.
<https://doi.org/10.1293/tox.2013-0060>
- Furukawa, S., Tsuji, N., Sugiyama, A., 2019. Morphology and physiology of rat placenta for toxicological evaluation. *J. Toxicol. Pathol.* 32, 1–17. <https://doi.org/10.1293/tox.2018-0042>
- Gaccioli, F., White, V., Capobianco, E., Powell, T.L., Jawerbaum, A., Jansson, T., 2013. Maternal Overweight Induced by a Diet with High Content of Saturated Fat Activates Placental mTOR and eIF2alpha Signaling and Increases Fetal Growth in Rats. *Biol. Reprod.* 89. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.109702>
- Galarza, R.A., Rhon Calderón, E.A., Cortez, A.E., Faletti, A.G., 2017. Maternal Overweight Disrupts the Sexual Maturation of the Offspring. *Reprod. Sci.* 24, 1284–1292. <https://doi.org/10.1177/1933719116683809>
- Georgiades, P., Ferguson-Smith, A.C., Burton, G.J., 2002. Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae. *Placenta* 23, 3–19. <https://doi.org/10.1053/plac.2001.0738>
- Ghibaudo, L., Cook, J., Farley, C., Van Heek, M., Hwa, J.J., 2002. Fat Intake Affects Adiposity, Comorbidity Factors, and Energy Metabolism of Sprague-Dawley Rats. *Obes. Res.* 10, 956–963. <https://doi.org/10.1038/oby.2002.130>
- Gohir, W., Whelan, F.J., Surette, M.G., Moore, C., Schertzer, J.D., Sloboda, D.M., 2015. Pregnancy-related changes in the maternal gut microbiota are dependent upon the mother's periconceptional diet. *Gut Microbes* 6, 310–320. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1086056>
- Goldsmith, Z.G., Dhanasekaran, D.N., 2007. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26, 3122–3142. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210407>
- Goldstein, J.A., Gallagher, K., Beck, C., Kumar, R., Gernand, A.D., 2020. Maternal-Fetal Inflammation in the Placenta and the Developmental Origins of Health and Disease. *Front. Immunol.* 11, 531543. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.531543>
- Goyal, D., Limesand, S.W., Goyal, R., 2019. Epigenetic responses and the developmental origins of health and disease. *J. Endocrinol.* 242, T105–T119. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0009>
- Gray, L.E.K., O'Hely, M., Ranganathan, S., Sly, P.D., Vuillermin, P., 2017. The Maternal Diet, Gut Bacteria, and Bacterial Metabolites during Pregnancy Influence Offspring Asthma. *Front. Immunol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00365>
- Gregorio, B.M., Souza-Mello, V., Carvalho, J.J., Mandarim-de-Lacerda, C.A., Aguila, M.B., 2010. Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 203, 495.e1–495.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.06.042>
- Grzęda, E., Matuszewska, J., Ziarniak, K., Gertig-Kolasa, A., Krzyśko- Pieczka, I., Skowrońska, B., Sliwowska, J.H., 2022. Animal Foetal Models of Obesity and Diabetes – From Laboratory to Clinical Settings. *Front. Endocrinol.* 13, 785674. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.785674>
- Guadix, P., Corrales, I., Vilariño-García, T., Rodríguez-Chacón, C., Sánchez-Jiménez, F., Jiménez-Cortegana, C., Dueñas, J.L., Sánchez-Margalet, V., Pérez-Pérez, A., 2023. Expression of nutrient transporters in placentas affected by gestational diabetes: role of leptin. *Front. Endocrinol.* 14, 1172831. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1172831>
- Gulecoglu Onem, M.G., Coker, C., Baysal, K., Altunyurt, S., Keskinoglu, P., 2021. The effects of pre-pregnancy obesity and gestational weight gain on maternal lipid profiles, fatty acids and insulin resistance. *J. Perinat. Med.* 49, 873–883. <https://doi.org/10.1515/jpm-2020-0540>

- Guo, S., 2014. Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J. Endocrinol.* 220, T1–T23. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0327>
- Gupta, N., Martin, P.M., Prasad, P.D., Ganapathy, V., 2006. SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. *Life Sci.* 78, 2419–2425. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.10.028>
- Habibullah, M., Jemmeh, K., Ouda, A., Haider, M.Z., Malki, M.I., Elzouki, A.-N., 2024. Metabolic-associated fatty liver disease: a selective review of pathogenesis, diagnostic approaches, and therapeutic strategies. *Front. Med.* 11, 1291501. <https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1291501>
- Hariri, N., Thibault, L., 2010. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr. Res. Rev.* 23, 270–299. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000168>
- Harriman, G., Greenwood, J., Bhat, S., Huang, X., Wang, R., Paul, D., Tong, L., Saha, A.K., Westlin, W.F., Kapeller, R., Harwood, H.J., 2016. Acetyl-CoA carboxylase inhibition by ND-630 reduces hepatic steatosis, improves insulin sensitivity, and modulates dyslipidemia in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520686113>
- Harrold, J.A., Dovey, T.M., Blundell, J.E., Halford, J.C.G., 2012. CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology* 63, 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.01.007>
- Hartstra, A.V., Schüppel, V., Imangaliyev, S., Schrantee, A., Prodan, A., Collard, D., Levin, E., Dallinga-Thie, G., Ackermans, M.T., Winkelmeijer, M., Havik, S.R., Metwaly, A., Lagkouvardos, I., Nier, A., Bergheim, I., Heikenwalder, M., Dunkel, A., Nederveen, A.J., Liebisch, G., Mancano, G., Claus, S.P., Benítez-Páez, A., La Fleur, S.E., Bergman, J.J., Gerdes, V., Sanz, Y., Booi, J., Kemper, E., Groen, A.K., Serlie, M.J., Haller, D., Nieuwdorp, M., 2020. Infusion of donor feces affects the gut–brain axis in humans with metabolic syndrome. *Mol. Metab.* 42, 101076. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101076>
- Hayes, E.K., Lechowicz, A., Petrik, J.J., Storozhuk, Y., Paez-Parent, S., Dai, Q., Samjoo, I.A., Mansell, M., Gruslin, A., Holloway, A.C., Raha, S., 2012. Adverse Fetal and Neonatal Outcomes Associated with a Life-Long High Fat Diet: Role of Altered Development of the Placental Vasculature. *PLoS ONE* 7, e33370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033370>
- He, Y., Sun, Y., Li, J., Peng, X., Li, W., Gao, Y., Wang, J., Ni, X., Pan, L., Deng, Z., 2023. Effects of Human Milk Fat Substitutes on Lipid Metabolism in First-Weaned Rats. *J. Agric. Food Chem.* 71, 13906–13919. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c02952>
- Heindel, J.J., Blumberg, B., Cave, M., Machtinger, R., Mantovani, A., Mendez, M.A., Nadal, A., Palanza, P., Panzica, G., Sargis, R., Vandenberg, L.N., Vom Saal, F., 2017. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reprod. Toxicol.* 68, 3–33. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.10.001>
- Heinecke, F., Fornes, D., Capobianco, E., Flores Quiroga, J.P., Labiano, M., Faletti, A.G., Jawerbaum, A., White, V., 2024. Intestinal alterations and mild glucose homeostasis impairments in the offspring born to overweight rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 587, 112201. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2024.112201>
- Heinecke, F., Mazzucco, M.B., Fornes, D., Roberti, S., Jawerbaum, A., White, V., 2020. The offspring from rats fed a fatty diet display impairments in the activation of liver peroxisome proliferator activated receptor alpha and features of fatty liver disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* 511, 110818. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110818>
- Henao-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W.Z., Strowig, T., Thaiss, C.A., Kau, A.L., Eisenbarth, S.C., Jurczak, M.J., Camporez, J.-P., Shulman, G.I., Gordon, J.I., Hoffman, H.M., Flavell, R.A., 2012. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 482, 179–185. <https://doi.org/10.1038/nature10809>

- Herrera, E., Amusquivar, E., López-Soldado, I., Ortega, H., 2006. Maternal Lipid Metabolism and Placental Lipid Transfer. *Horm. Res. Paediatr.* 65, 59–64.
<https://doi.org/10.1159/000091507>
- Herrera, E., Desoye, G., 2016. Maternal and fetal lipid metabolism under normal and gestational diabetic conditions. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 26, 109–127.
<https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0025>
- Herrera, E., Ortega-Senovilla, H., 2014. Lipid Metabolism During Pregnancy and its Implications for Fetal Growth. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 15, 24–31.
<https://doi.org/10.2174/1389201015666140330192345>
- Hilal, G., Fatma, T., Ferruh, Y., Sabire, G., Yüksel, A., 2020. Effect of high-fat diet on the various morphological parameters of the ovary. *Anat. Cell Biol.* 53, 58–67.
<https://doi.org/10.5115/acb.19.082>
- Hirschmugl, B., Desoye, G., Catalano, P., Klymiuk, I., Scharnagl, H., Payr, S., Kitzinger, E., Schliefssteiner, C., Lang, U., Wadsack, C., Hauguel-de Mouzon, S., 2017. Maternal obesity modulates intracellular lipid turnover in the human term placenta. *Int. J. Obes.* 41, 317–323. <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.188>
- Hoffman, D.J., Powell, T.L., Barrett, E.S., Hardy, D.B., 2021. Developmental origins of metabolic diseases. *Physiol. Rev.* 101, 739–795. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2020>
- Hotamisligil, G.S., 2017. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature* 542, 177–185. <https://doi.org/10.1038/nature21363>
- Huang, X., Liu, X., Li, X., Zhang, Y., Gao, J., Yang, Y., Jiang, Y., Gao, H., Sun, C., Xuan, L., Zhao, L., Song, J., Bao, H., Zhou, Z., Li, S., Zhang, X., Lu, Y., Zhong, X., Yang, B., Pan, Z., 2023. Cullin-associated and neddylation-dissociated protein 1 (CAND1) alleviates NAFLD by reducing ubiquitinated degradation of ACAA2. *Nat. Commun.* 14, 4620.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-40327-5>
- Huang, Y.-J., Wang, P.-M., Tang, K.-S., Chen, C.-J., Huang, Y.-H., Tiao, M.-M., 2022. Butyrate ameliorates maternal high-fat diet-induced fetal liver cellular apoptosis. *PLOS ONE* 17, e0270657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270657>
- Hufnagel, A., Dearden, L., Fernandez-Twinn, D.S., Ozanne, S.E., 2022. Programming of cardiometabolic health: the role of maternal and fetal hyperinsulinaemia. *J. Endocrinol.* 253, R47–R63. <https://doi.org/10.1530/JOE-21-0332>
- Ilyés, T., Silaghi, C.N., Crăciun, A.M., 2022. Diet-Related Changes of Short-Chain Fatty Acids in Blood and Feces in Obesity and Metabolic Syndrome. *Biology* 11, 1556.
<https://doi.org/10.3390/biology11111556>
- Implantation, Maternofetal Exchange and Vascular Relationships, 2008. , in: *Comparative Placentation*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 47–81.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-78797-6_2
- Janero, D.R., 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 515–540.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90131-2](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90131-2)
- Jansson, T., Powell, T.L., 2007. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin. Sci.* 113, 1–13.
<https://doi.org/10.1042/CS20060339>
- Jawerbaum, A., White, V., 2017. Review on intrauterine programming: Consequences in rodent models of mild diabetes and mild fat overfeeding are not mild. *Placenta* 52, 21–32.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.02.009>
- Jin, C.J., Sellmann, C., Engstler, A.J., Ziegenhardt, D., Bergheim, I., 2015. Supplementation of sodium butyrate protects mice from the development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Br. J. Nutr.* 114, 1745–1755. <https://doi.org/10.1017/S0007114515003621>
- Kalupahana, N.S., Moustaid-Moussa, N., Claycombe, K.J., 2012. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.* 33, 26–34.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.011>

- Kazantzis, M., Stahl, A., 2012. Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1821, 852–857.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.09.010>
- Kelly, A.C., Powell, T.L., Jansson, T., 2020. Placental function in maternal obesity. *Clin. Sci.* 134, 961–984. <https://doi.org/10.1042/CS20190266>
- Kim, C.H., Park, J., Kim, M., 2014. Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids, T Cells, and Inflammation. *Immune Netw.* 14, 277. <https://doi.org/10.4110/in.2014.14.6.277>
- Kim, D.W., Young, S.L., Grattan, D.R., Jasoni, C.L., 2014. Obesity During Pregnancy Disrupts Placental Morphology, Cell Proliferation, and Inflammation in a Sex-Specific Manner Across Gestation in the Mouse¹. *Biol. Reprod.* 90.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.117259>
- King, V., Hibbert, N., Seckl, J.R., Norman, J.E., Drake, A.J., 2013. The effects of an obesogenic diet during pregnancy on fetal growth and placental gene expression are gestation dependent. *Placenta* 34, 1087–1090. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.09.006>
- Kobayashi, T., Iwaki, M., Nakajima, A., Nogami, A., Yoneda, M., 2022. Current Research on the Pathogenesis of NAFLD/NASH and the Gut–Liver Axis: Gut Microbiota, Dysbiosis, and Leaky-Gut Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 11689.
<https://doi.org/10.3390/ijms231911689>
- Kozlosky, D., Barrett, E., Aleksunes, L.M., 2022. Regulation of Placental Efflux Transporters during Pregnancy Complications. *Drug Metab. Dispos.* 50, 1364–1375.
<https://doi.org/10.1124/dmd.121.000449>
- Kramer, A.C., Jansson, T., Bale, T.L., Powell, T.L., 2023. Maternal-fetal cross-talk via the placenta: influence on offspring development and metabolism. *Development* 150, dev202088. <https://doi.org/10.1242/dev.202088>
- Ladyman, S.R., Brooks, V.L., 2021. Central actions of insulin during pregnancy and lactation. *J. Neuroendocrinol.* 33, e12946. <https://doi.org/10.1111/jne.12946>
- Lager, S., Jansson, N., Olsson, A.L., Wennergren, M., Jansson, T., Powell, T.L., 2011. Effect of IL-6 and TNF- α on fatty acid uptake in cultured human primary trophoblast cells. *Placenta* 32, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.10.012>
- Lager, S., Powell, T.L., 2012. Regulation of Nutrient Transport across the Placenta. *J. Pregnancy* 2012, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2012/179827>
- Lager, S., Ramirez, V.I., Gaccioli, F., Jang, B., Jansson, T., Powell, T.L., 2016. Protein expression of fatty acid transporter 2 is polarized to the trophoblast basal plasma membrane and increased in placentas from overweight/obese women. *Placenta* 40, 60–66.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.02.010>
- Lane, M., Robker, R.L., Robertson, S.A., 2014. Parenting from before conception. *Science* 345, 756–760. <https://doi.org/10.1126/science.1254400>
- Lecoutre, S., Maqdasy, S., Breton, C., 2021. Maternal obesity as a risk factor for developing diabetes in offspring: An epigenetic point of view. *World J. Diabetes* 12, 366–382.
<https://doi.org/10.4239/wjd.v12.i4.366>
- Lecoutre, S., Maqdasy, S., Lambert, M., Breton, C., 2023. The Impact of Maternal Obesity on Adipose Progenitor Cells. *Biomedicines* 11, 3252.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines11123252>
- Lei, X., Xu, Q., Li, Chunmin, Niu, B., Ming, Y., Li, J., Tang, Y., Li, Xiaoyun, Tang, J., Wu, J., Ju, Y., Yao, L., Wang, B., Miao, Q., Zhong, W., Zhi, Y., Xu, L., Li, Chaojun, Li, Xiaobo, Mao, Y., 2022. Egr1 confers protection against acetaminophen-induced hepatotoxicity via transcriptional upregulating of Acaa2. *Int. J. Biol. Sci.* 18, 3800–3817.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.71781>
- Lepe, M., Bacardí Gascón, M., Castañeda-González, L.M., Pérez Morales, M.E., Jiménez Cruz, A., 2011. Effect of maternal obesity on lactation: systematic review. *Nutr. Hosp.* 26, 1266–1269. <https://doi.org/10.1590/S0212-16112011000600012>

- Lewis, R.M., Desoye, G., 2017. Placental Lipid and Fatty Acid Transfer in Maternal Overnutrition. *Ann. Nutr. Metab.* 70, 228–231. <https://doi.org/10.1159/000463397>
- Lewis, R.M., Wadsack, C., Desoye, G., 2018. Placental fatty acid transfer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 21, 78–82. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000443>
- Li, H.-P., Chen, X., Li, M.-Q., 2013a. Gestational diabetes induces chronic hypoxia stress and excessive inflammatory response in murine placenta. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 6, 650–659.
- Li, H.-P., Chen, X., Li, M.-Q., 2013b. Butyrate alleviates metabolic impairments and protects pancreatic β cell function in pregnant mice with obesity. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 6, 1574–1584.
- Lian, C.-Y., Zhai, Z.-Z., Li, Z.-F., Wang, L., 2020. High fat diet-triggered non-alcoholic fatty liver disease: A review of proposed mechanisms. *Chem. Biol. Interact.* 330, 109199. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109199>
- Liang, C., DeCourcy, K., Prater, M.R., 2010. High-saturated-fat diet induces gestational diabetes and placental vasculopathy in C57BL/6 mice. *Metabolism* 59, 943–950. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.10.015>
- Lin, Y., Fang, Z., Che, L., Xu, S., Wu, D., Wu, C., Wu, X., 2014. Use of Sodium Butyrate as an Alternative to Dietary Fiber: Effects on the Embryonic Development and Anti-Oxidative Capacity of Rats. *PLoS ONE* 9, e97838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097838>
- Lindsay, K.L., Buss, C., Wadhwa, P.D., Entringer, S., 2019. The Interplay Between Nutrition and Stress in Pregnancy: Implications for Fetal Programming of Brain Development. *Biol. Psychiatry* 85, 135–149. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.06.021>
- Lodhi, I.J., Semenkovich, C.F., 2014. Peroxisomes: A Nexus for Lipid Metabolism and Cellular Signaling. *Cell Metab.* 19, 380–392. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.002>
- Louis, P., Flint, H.J., 2009. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol. Lett.* 294, 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x>
- Louwagie, E.J., Larsen, T.D., Wachal, A.L., Baack, M.L., 2018. Placental lipid processing in response to a maternal high-fat diet and diabetes in rats. *Pediatr. Res.* 83, 712–722. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.288>
- Lucero, D., Miksztowicz, V., Macri, V., López, G.H., Friedman, S., Berg, G., Zago, V., Schreier, L., 2015. Overproduction of altered VLDL in an insulin-resistance rat model: Influence of SREBP-1c and PPAR- α . *Clínica E Investig. En Arterioscler.* 27, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2014.11.002>
- Lynch, C., Chan, C.S., Drake, A.J., 2017. Early life programming and the risk of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 8, 263–272. <https://doi.org/10.1017/S2040174416000805>
- Lyu, X., Wang, S., Zhong, J., Cai, L., Zheng, Y., Zhou, Y., Zhou, Y., Chen, Q., Li, Q., 2023. Gut microbiome interacts with pregnancy hormone metabolites in gestational diabetes mellitus. *Front. Microbiol.* 14, 1175065. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1175065>
- Macia, L., Tan, J., Vieira, A.T., Leach, K., Stanley, D., Luong, S., Maruya, M., Ian McKenzie, C., Hijikata, A., Wong, C., Binge, L., Thorburn, A.N., Chevalier, N., Ang, C., Marino, E., Robert, R., Offermanns, S., Teixeira, M.M., Moore, R.J., Flavell, R.A., Fagarasan, S., Mackay, C.R., 2015. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat. Commun.* 6, 6734. <https://doi.org/10.1038/ncomms7734>
- Malarkey, D.E., Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G., Maronpot, R.R., 2005. New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology. *Toxicol. Pathol.* 33, 27–34. <https://doi.org/10.1080/01926230590881826>
- Malassine, A., Frendo, J.-L., Evain-Brion, D., 2003. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum. Reprod. Update* 9, 531–539. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg043>

- Maliqueo, M., Cruz, G., Espina, C., Contreras, I., García, M., Echiburú, B., Crisosto, N., 2017. Obesity during pregnancy affects sex steroid concentrations depending on fetal gender. *Int. J. Obes.* 41, 1636–1645. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.159>
- Mannaerts, G.P., Van Veldhoven, P.P., Casteels, M., 2000. Peroxisomal Lipid Degradation via β and β -oxidation in Mammals. *Cell Biochem. Biophys.* 32, 73–87. <https://doi.org/10.1385/CBB:32:1-3:73>
- Mao, J., Zhang, X., Sieli, P.T., Falduto, M.T., Torres, K.E., Rosenfeld, C.S., 2010. Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 5557–5562. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000440107>
- Mark, P.J., Sisala, C., Connor, K., Patel, R., Lewis, J.L., Vickers, M.H., Waddell, B.J., Sloboda, D.M., 2011. A maternal high-fat diet in rat pregnancy reduces growth of the fetus and the placental junctional zone, but not placental labyrinth zone growth. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 2, 63–70. <https://doi.org/10.1017/S2040174410000681>
- Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 424, 83–95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00010-X)
- Marques, C., Meireles, M., Norberto, S., Leite, J., Freitas, J., Pestana, D., Faria, A., Calhau, C., 2016. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte* 5, 11–21. <https://doi.org/10.1080/21623945.2015.1061723>
- Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., Gitto, E., Arrigo, T., 2014. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 378–400. <https://doi.org/10.3390/ijms16010378>
- Mashek, D.G., 2013. Hepatic Fatty Acid Trafficking: Multiple Forks in the Road. *Adv. Nutr.* 4, 697–710. <https://doi.org/10.3945/an.113.004648>
- Mayorga-Ramos, A., Barba-Ostria, C., Simancas-Racines, D., Guamán, L.P., 2022. Protective role of butyrate in obesity and diabetes: New insights. *Front. Nutr.* 9, 1067647. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1067647>
- Mazzucco, M.B., Fornes, D., Capobianco, E., Higa, R., Jawerbaum, A., White, V., 2016. Maternal saturated-fat-rich diet promotes leptin resistance in fetal liver lipid catabolism and programs lipid homeostasis impairments in the liver of rat offspring. *J. Nutr. Biochem.* 27, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.08.019>
- Mazzucco, M.B., Higa, R., Capobianco, E., Kurtz, M., Jawerbaum, A., White, V., 2013a. Saturated fat-rich diet increases fetal lipids and modulates LPL and leptin receptor expression in rat placentas. *J. Endocrinol.* 217, 303–315. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0021>
- Mazzucco, M.B., Higa, R., Capobianco, E., Kurtz, M., Jawerbaum, A., White, V., 2013b. Saturated fat-rich diet increases fetal lipids and modulates LPL and leptin receptor expression in rat placentas. *J. Endocrinol.* 217, 303–315. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0021>
- McGarry, J.D., Mannaerts, G.P., Foster, D.W., 1977. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J. Clin. Invest.* 60, 265–270. <https://doi.org/10.1172/JCI108764>
- McNabney, S., Henagan, T., 2017. Short Chain Fatty Acids in the Colon and Peripheral Tissues: A Focus on Butyrate, Colon Cancer, Obesity and Insulin Resistance. *Nutrients* 9, 1348. <https://doi.org/10.3390/nu9121348>
- Mendez-Sanchez, N., Cruz-Ramon, V.C., Ramirez-Perez, O.L., Hwang, J.P., Barranco-Fragoso, B., Cordova-Gallardo, J., 2018. New Aspects of Lipotoxicity in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2034. <https://doi.org/10.3390/ijms19072034>
- Meneghini, M.A., Galarza, R.A., Flores Quiroga, J.P., Faletti, A.G., 2022. Diet-induced maternal obesity and overnutrition cause a decrease in the sperm quality of the offspring. *J. Nutr. Biochem.* 103, 108966. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.108966>

- Meneghini, M.A., Quiroga, J.P.F., Heinecke, F., Galarza, R.A., White, V., Faletti, A.G., 2024. Impact of diet-induced maternal obesity on the reproductive capacity of F1 female offspring and the early development of the second generation. *J. Nutr. Biochem.* 109700. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2024.109700>
- Ministerio de Salud, 2024. *Sobrepeso y Obesidad*. Argentina.
- Murabayashi, N., Sugiyama, T., Zhang, L., Kamimoto, Y., Umekawa, T., Ma, N., Sagawa, N., 2013. Maternal high-fat diets cause insulin resistance through inflammatory changes in fetal adipose tissue. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 169, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.02.003>
- Myatt, L., Maloyan, A., 2016. Obesity and Placental Function. *Semin. Reprod. Med.* 34, 042–049. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1570027>
- Nakamura, M.T., Yudell, B.E., Loor, J.J., 2014. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 53, 124–144. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.12.001>
- Nathanielsz, P.W., Ford, S.P., Long, N.M., Vega, C.C., Reyes-Castro, L.A., Zambrano, E., 2013. Interventions to prevent adverse fetal programming due to maternal obesity during pregnancy. *Nutr. Rev.* 71, S78–S87. <https://doi.org/10.1111/nure.12062>
- Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Bloc’h, J.L., Siliart, B., Dumon, H., 2008. Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92, 272–283. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x>
- Niculescu, M.D., Lupu, D.S., 2009. High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.08.005>
- Nirala, S., Tan, X.-R., Shafiq, M., Basnet, R., Singh, A., 2024. Maternal High Fat Diet and its Expressions in the Heart and Liver in the Mice Embryogenesis. *Curr. Mol. Med.* 24, 889–898. <https://doi.org/10.2174/1566524023666230605142119>
- Nuriel-Ohayon, M., Neuman, H., Koren, O., 2016. Microbial Changes during Pregnancy, Birth, and Infancy. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01031>
- Odegaard, J.I., Chawla, A., 2011. Alternative Macrophage Activation and Metabolism. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6, 275–297. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130138>
- Olzmann, J.A., Carvalho, P., 2019. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 137–155. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>
- Onal, G., Kutlu, O., Gozuacik, D., Dokmeci Emre, S., 2017. Lipid Droplets in Health and Disease. *Lipids Health Dis.* 16, 128. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0521-7>
- Ornoy, A., Miller, R.K., 2023. Yolk sac development, function and role in rodent pregnancy. *Birth Defects Res.* 115, 1243–1254. <https://doi.org/10.1002/bdr2.2172>
- Pafili, K., Roden, M., 2021. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) from pathogenesis to treatment concepts in humans. *Mol. Metab.* 50, 101122. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101122>
- Palleja, A., Mikkelsen, K.H., Forslund, S.K., Kashani, A., Allin, K.H., Nielsen, T., Hansen, T.H., Liang, S., Feng, Q., Zhang, C., Pyl, P.T., Coelho, L.P., Yang, H., Wang, Jian, Typas, A., Nielsen, M.F., Nielsen, H.B., Bork, P., Wang, Jun, Vilsbøll, T., Hansen, T., Knop, F.K., Arumugam, M., Pedersen, O., 2018. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nat. Microbiol.* 3, 1255–1265. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0257-9>
- Palmisano, B.T., Zhu, L., Eckel, R.H., Stafford, J.M., 2018. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism. *Mol. Metab.* 15, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.008>
- Pan, P., Oshima, K., Huang, Y., Agle, K.A., Drobyski, W.R., Chen, X., Zhang, J., Yearsley, M.M., Yu, J., Wang, L., 2018. Loss of FFAR 2 promotes colon cancer by epigenetic dysregulation of inflammation suppressors. *Int. J. Cancer* 143, 886–896. <https://doi.org/10.1002/ijc.31366>

- Paparo, L., Nocerino, R., Ciaglia, E., Di Scala, C., De Caro, C., Russo, R., Trinchese, G., Aitoro, R., Amoroso, A., Bruno, C., Di Costanzo, M., Passariello, A., Messina, F., Agangi, A., Napolitano, M., Voto, L., Gatta, G.D., Pisapia, L., Montella, F., Mollica, M.P., Calignano, A., Puca, A., Berni Canani, R., 2021. Butyrate as a bioactive human milk protective component against food allergy. *Allergy* 76, 1398–1415. <https://doi.org/10.1111/all.14625>
- Parada Venegas, D., De la Fuente, M.K., Landskron, G., González, M.J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H.J.M., Faber, K.N., Hermoso, M.A., 2019. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front. Immunol.* 10, 277. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>
- Pararasa, C., Bailey, C.J., Griffiths, H.R., 2015. Ageing, adipose tissue, fatty acids and inflammation. *Biogerontology* 16, 235–248. <https://doi.org/10.1007/s10522-014-9536-x>
- Parisi, F., Milazzo, R., Savasi, V.M., Cetin, I., 2021. Maternal Low-Grade Chronic Inflammation and Intrauterine Programming of Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1732. <https://doi.org/10.3390/ijms22041732>
- Pérez, L.M., Pareja-Galeano, H., Sanchis-Gomar, F., Emanuele, E., Lucia, A., Gálvez, B.G., 2016. ‘Adipaging’: ageing and obesity share biological hallmarks related to a dysfunctional adipose tissue. *J. Physiol.* 594, 3187–3207. <https://doi.org/10.1113/JP271691>
- Pérez-Pérez, A., Vilariño-García, T., Guadix, P., Dueñas, J.L., Sánchez-Margalet, V., 2020. Leptin and Nutrition in Gestational Diabetes. *Nutrients* 12, 1970. <https://doi.org/10.3390/nu12071970>
- Picó, C., Reis, F., Egas, C., Mathias, P., Matafome, P., 2021. Lactation as a programming window for metabolic syndrome. *Eur. J. Clin. Invest.* 51, e13482. <https://doi.org/10.1111/eci.13482>
- Prentice, P.M., Schoemaker, M.H., Vervoort, J., Hettinga, K., Lambers, T.T., van Tol, E.A.F., Acerini, C.L., Olga, L., Petry, C.J., Hughes, I.A., Koulman, A., Ong, K.K., Dunger, D.B., 2019. Human Milk Short-Chain Fatty Acid Composition is Associated with Adiposity Outcomes in Infants. *J. Nutr.* 149, 716–722. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy320>
- Pruis, M.G.M., Lendvai, Á., Bloks, V.W., Zwier, M.V., Baller, J.F.W., De Bruin, A., Groen, A.K., Plösch, T., 2014. Maternal western diet primes non-alcoholic fatty liver disease in adult mouse offspring. *Acta Physiol.* 210, 215–227. <https://doi.org/10.1111/apha.12197>
- Purcell, A.R., Glastras, S.J., 2023. Maternal Weight Management to Prevent the Developmental Programming of MAFLD in Offspring of Obese Mothers. *Nutrients* 15, 2155. <https://doi.org/10.3390/nu15092155>
- Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H., Mangelsdorf, D.J., 2002. Regulation of ATP-binding Cassette Sterol Transporters ABCG5 and ABCG8 by the Liver X Receptors α and β . *J. Biol. Chem.* 277, 18793–18800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109927200>
- Reynolds, C., Gray, C., Li, M., Segovia, S., Vickers, M., 2015. Early Life Nutrition and Energy Balance Disorders in Offspring in Later Life. *Nutrients* 7, 8090–8111. <https://doi.org/10.3390/nu7095384>
- Reynolds, C.M., Vickers, M.H., Harrison, C.J., Segovia, S.A., Gray, C., 2015. Maternal high fat and/or salt consumption induces sex-specific inflammatory and nutrient transport in the rat placenta. *Physiol. Rep.* 3, e12399. <https://doi.org/10.14814/phy2.12399>
- Rhind, S., Rae, M., Brooks, A., 2001. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 122, 205–214. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220205>
- Roberts, C.T., Sohlstrom, A., Kind, K.L., Earl, R.A., Khong, T.Y., Robinson, J.S., Owens, P.C., Owens, J.A., 2001. Maternal Food Restriction Reduces the Exchange Surface Area and Increases the Barrier Thickness of the Placenta in the Guinea-pig. *Placenta* 22, 177–185. <https://doi.org/10.1053/plac.2000.0602>

- Rothchild, I., 1981. The Regulation of the Mammalian Corpus Luteum, in: Proceedings of the 1980 Laurentian Hormone Conference. Elsevier, pp. 183–298.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-571137-1.50009-8>
- Rui, L., 2014. Energy Metabolism in the Liver, in: Terjung, R. (Ed.), Comprehensive Physiology. Wiley, pp. 177–197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>
- Sathishkumar, K., Balakrishnan, M., Chinnathambi, V., Chauhan, M., Hankins, G.D.V., Yallampalli, C., 2012. Fetal sex-related dysregulation in testosterone production and their receptor expression in the human placenta with preeclampsia. *J. Perinatol.* 32, 328–335. <https://doi.org/10.1038/jp.2011.101>
- Sato, R., 2010. Sterol metabolism and SREBP activation. *Arch. Biochem. Biophys.* 501, 177–181. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.06.004>
- Scheidt, T.B., Brightwell, A.L., Easson, S.H., Thompson, J.A., 2023a. Maternal obesity and programming of metabolic syndrome in the offspring: searching for mechanisms in the adipocyte progenitor pool. *BMC Med.* 21, 50. <https://doi.org/10.1186/s12916-023-02730-z>
- Scheidt, T.B., Brightwell, A.L., Easson, S.H., Thompson, J.A., 2023b. Maternal obesity and programming of metabolic syndrome in the offspring: searching for mechanisms in the adipocyte progenitor pool. *BMC Med.* 21, 50. <https://doi.org/10.1186/s12916-023-02730-z>
- Scorletti, E., Carr, R.M., 2022. A new perspective on NAFLD: Focusing on lipid droplets. *J. Hepatol.* 76, 934–945. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.11.009>
- Segain, J.-P., 2000. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 47, 397–403. <https://doi.org/10.1136/gut.47.3.397>
- Sferruzzi-Perri, A.N., Camm, E.J., 2016. The Programming Power of the Placenta. *Front. Physiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00033>
- Sferruzzi-Perri, A.N., Vaughan, O.R., Coan, P.M., Suciu, M.C., Darbyshire, R., Constancia, M., Burton, G.J., Fowden, A.L., 2011. Placental-Specific Igf2 Deficiency Alters Developmental Adaptations to Undernutrition in Mice. *Endocrinology* 152, 3202–3212. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0240>
- Shook, L.L., James, K.E., Roberts, D.J., Powe, C.E., Perlis, R.H., Thornburg, K.L., O'Tierney-Ginn, P.F., Edlow, A.G., 2023. Sex-specific impact of maternal obesity on fetal placental macrophages and cord blood triglycerides. *Placenta* 140, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2023.08.001>
- Silva, J.F., Serakides, R., 2016. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. *Cell Adhes. Migr.* 10, 88–110. <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1120397>
- Soares, M.J., Chakraborty, D., Karim Rumi, M.A., Konno, T., Renaud, S.J., 2012. Rat placentation: An experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. *Placenta* 33, 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.11.026>
- Soyal, S.M., Nofziger, C., Dossena, S., Paulmichl, M., Patsch, W., 2015. Targeting SREBPs for treatment of the metabolic syndrome. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.010>
- Speakman, J.R., 2019. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *Int. J. Obes.* 43, 1491–1492. <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0363-7>
- Stefanovic-Racic, M., Perdomo, G., Mantell, B.S., Sipula, I.J., Brown, N.F., O'Doherty, R.M., 2008. A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 294, E969–E977. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00497.2007>
- Stewart, M.S., Heerwagen, M.J.R., Friedman, J.E., 2013. Developmental Programming of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Redefining the “First Hit.” *Clin. Obstet. Gynecol.* 56, 577–590. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e3182a09760>

- Storch, J., Corsico, B., 2008. The Emerging Functions and Mechanisms of Mammalian Fatty Acid-Binding Proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 28, 73–95.
<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093710>
- Sun, B., Jia, Y., Hong, J., Sun, Q., Gao, S., Hu, Y., Zhao, N., Zhao, R., 2018. Sodium Butyrate Ameliorates High-Fat-Diet-Induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α -Mediated Activation of β Oxidation and Suppression of Inflammation. *J. Agric. Food Chem.* 66, 7633–7642.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01189>
- Sun, B., Jia, Y., Yang, S., Zhao, N., Hu, Y., Hong, J., Gao, S., Zhao, R., 2019. Sodium butyrate protects against high-fat diet-induced oxidative stress in rat liver by promoting expression of nuclear factor E2-related factor 2. *Br. J. Nutr.* 122, 400–410.
<https://doi.org/10.1017/S0007114519001399>
- Suter, M.A., Aagaard, K.M., 2020. The impact of tobacco chemicals and nicotine on placental development. *Prenat. Diagn.* 40, 1193–1200. <https://doi.org/10.1002/pd.5660>
- Sztalryd, C., Kimmel, A.R., 2014. Perilipins: Lipid droplet coat proteins adapted for tissue-specific energy storage and utilization, and lipid cytoprotection. *Biochimie* 96, 96–101.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.08.026>
- Thompson, M.D., 2020. Developmental Programming of NAFLD by Parental Obesity. *Hepatol. Commun.* 4, 1392–1403. <https://doi.org/10.1002/hep4.1578>
- Tissot Van Patot, M.C., Murray, A.J., Beckey, V., Cindrova-Davies, T., Johns, J., Zwerdinger, L., Jauniaux, E., Burton, G.J., Serkova, N.J., 2010. Human placental metabolic adaptation to chronic hypoxia, high altitude: hypoxic preconditioning. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298, R166–R172. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00383.2009>
- Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y.S., Parker, H.E., Habib, A.M., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F., Gribble, F.M., 2012. Short-Chain Fatty Acids Stimulate Glucagon-Like Peptide-1 Secretion via the G-Protein-Coupled Receptor FFAR2. *Diabetes* 61, 364–371. <https://doi.org/10.2337/db11-1019>
- Trayhurn, P., 2013. Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. *Physiol. Rev.* 93, 1–21. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2012>
- Trefts, E., Gannon, M., Wasserman, D.H., 2017. The liver. *Curr. Biol. CB* 27, R1147–R1151.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
- Trovato, F.M., Catalano, D., Musumeci, G., Trovato, G.M., 2014. 4Ps medicine of the fatty liver: the research model of predictive, preventive, personalized and participatory medicine—recommendations for facing obesity, fatty liver and fibrosis epidemics. *EPMA J.* 5, 21. <https://doi.org/10.1186/1878-5085-5-21>
- Tsuduk, T., Kitano, Y., Honma, T., Kijima, R., Ikeda, I., 2013. High Dietary Fat Intake during Lactation Promotes Development of Diet-Induced Obesity in Male Offspring of Mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 59, 384–392. <https://doi.org/10.3177/jnsv.59.384>
- Van Der Beek, C.M., Bloemen, J.G., Van Den Broek, M.A., Lenaerts, K., Venema, K., Buurman, W.A., Dejong, C.H., 2015. Hepatic Uptake of Rectally Administered Butyrate Prevents an Increase in Systemic Butyrate Concentrations in Humans^{1–3}. *J. Nutr.* 145, 2019–2024. <https://doi.org/10.3945/jn.115.211193>
- Vaughan, O.R., Sferruzzi-Perri, A.N., Coan, P.M., Fowden, A.L., 2012. Environmental regulation of placental phenotype: implications for fetal growth. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 80.
<https://doi.org/10.1071/RD11909>
- Virtue, S., Vidal-Puig, A., 2010. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome — An allostatic perspective. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1801, 338–349. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.12.006>
- Visiedo, F., Bugatto, F., Sánchez, V., Cózar-Castellano, I., Bartha, J.L., Perdomo, G., 2013. High glucose levels reduce fatty acid oxidation and increase triglyceride accumulation in human placenta. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 305, E205–E212.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00032.2013>

- Vital, M., Howe, A.C., Tiedje, J.M., 2014. Revealing the Bacterial Butyrate Synthesis Pathways by Analyzing (Meta)genomic Data. *mBio* 5, e00889-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00889-14>
- Wallace, J.G., Bellissimo, C.J., Yeo, E., Fei Xia, Y., Petrik, J.J., Surette, M.G., Bowdish, D.M.E., Sloboda, D.M., 2019. Obesity during pregnancy results in maternal intestinal inflammation, placental hypoxia, and alters fetal glucose metabolism at mid-gestation. *Sci. Rep.* 9, 17621. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54098-x>
- Wang, C., Li, H., Luo, C., Li, Y., Zhang, Y., Yun, D., Mu, D., Zhou, K., Hua, Y., 2015. The effect of maternal obesity on the expression and functionality of placental P-glycoprotein: Implications in the individualized transplacental digoxin treatment for fetal heart failure. *Placenta* 36, 1138–1147. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.08.007>
- Wang, H.-B., Wang, P.-Y., Wang, X., Wan, Y.-L., Liu, Y.-C., 2012. Butyrate Enhances Intestinal Epithelial Barrier Function via Up-Regulation of Tight Junction Protein Claudin-1 Transcription. *Dig. Dis. Sci.* 57, 3126–3135. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2259-4>
- Wardani, H.A., Rahmadi, M., Ardianto, C., Balan, S.S., Kamaruddin, N.S., Khotib, J., 2019. Development of nonalcoholic fatty liver disease model by high-fat diet in rats. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 30, /j/jbcpp.2019.30.issue-6/jbcpp-2019-0258/jbcpp-2019-0258.xml. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2019-0258>
- Wierzchowska-Opoka, M., Grunwald, A., Rekowska, A.K., Łomża, A., Mekler, J., Santiago, M., Kabala, Z., Kimber-Trojnar, Ż., Leszczyńska-Gorzelak, B., 2023. Impact of Obesity and Diabetes in Pregnant Women on Their Immunity and Vaccination. *Vaccines* 11, 1247. <https://doi.org/10.3390/vaccines11071247>
- World Health Organization, 2024a. Obesity and Overweight.
- World Health Organization, 2024b. BMI among adults.
- World Obesity Atlas 2022, 2022.
- Wu, L.L., Russell, D.L., Wong, S.L., Chen, M., Tsai, T.-S., St John, J.C., Norman, R.J., Febbraio, M.A., Carroll, J., Robker, R.L., 2015. Mitochondrial dysfunction in oocytes of obese mothers: transmission to offspring and reversal by pharmacological endoplasmic reticulum stress inhibitors. *Development* 142, 681–691. <https://doi.org/10.1242/dev.114850>
- Yang, S., Fujikado, N., Kolodin, D., Benoist, C., Mathis, D., 2015. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance. *Science* 348, 589–594. <https://doi.org/10.1126/science.aaa7017>
- Yao, S., Lopez-Tello, J., Sferruzzi-Perri, A.N., 2021. Developmental programming of the female reproductive system—a review. *Biol. Reprod.* 104, 745–770. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa232>
- Yokomizo, H., Inoguchi, T., Sonoda, N., Sakaki, Y., Maeda, Y., Inoue, T., Hirata, E., Takei, R., Ikeda, N., Fujii, M., Fukuda, K., Sasaki, H., Takayanagi, R., 2014. Maternal high-fat diet induces insulin resistance and deterioration of pancreatic β -cell function in adult offspring with sex differences in mice. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 306, E1163–E1175. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00688.2013>
- Yu, P., Chen, Y., Ge, C., Wang, H., 2021. Sexual dimorphism in placental development and its contribution to health and diseases. *Crit. Rev. Toxicol.* 51, 555–570. <https://doi.org/10.1080/10408444.2021.1977237>
- Zhang, N., Qu, Y., Qin, B., 2021. Sodium butyrate ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by upregulating miR-150 to suppress CXCR4 expression. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 48, 1125–1136. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13497>
- Zhang, X., Li, S., Zhou, Y., Su, W., Ruan, X., Wang, B., Zheng, F., Warner, M., Gustafsson, J.-Å., Guan, Y., 2017. Ablation of cytochrome P450 omega-hydroxylase 4A14 gene attenuates hepatic steatosis and fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 3181–3185. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700172114>

- Zhou, J., Gao, S., Chen, J., Zhao, R., Yang, X., 2016. Maternal sodium butyrate supplement elevates the lipolysis in adipose tissue and leads to lipid accumulation in offspring liver of weaning-age rats. *Lipids Health Dis.* 15, 119. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0289-1>
- Zhu, M.J., Du, M., Nathanielsz, P.W., Ford, S.P., 2010. Maternal obesity up-regulates inflammatory signaling pathways and enhances cytokine expression in the mid-gestation sheep placenta. *Placenta* 31, 387–391. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.02.002>
- Ziętek, M., Celewicz, Z., Szczuko, M., 2021. Short-Chain Fatty Acids, Maternal Microbiota and Metabolism in Pregnancy. *Nutrients* 13, 1244. <https://doi.org/10.3390/nu13041244>